

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Amanda Ramos Della Fonte

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação
de iodo em amostras de premixes e soluções
expectorantes usando técnicas espectrométricas**

**Vitória
2014**

Amanda Ramos Della Fonte

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de iodo
em amostras de premixes e soluções expectorantes usando
técnicas espectrométricas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosângela Cristina Barthus.

**VITÓRIA
2014**

Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de iodo em amostras de premixes e soluções expectorantes usando técnicas espectrométricas

Amanda Ramos Della Fonte

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química na área de concentração de Química Analítica.

Aprovada em 26 de Agosto de 2014 por:

Prof^a. Dr^a. Rosângela Cristina Barthus
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde
Universidade Federal do Espírito Santo
Avaliador interno

Prof^a. Dr^a. Araceli Verônica Flores Nardy Ribeiro
Instituto Federal do Espírito Santo
Avaliador externo

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Della Fonte, Amanda Ramos, 1988-
D357d Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação
de iodo em amostras de premixes e soluções expectorantes
usando técnicas espectrométricas / Amanda Ramos Della Fonte.
– 2014.
146 f. : il.

Orientador: Rosângela Cristina Barthus.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Iodo. 2. Espectrofotometria. 3. Parâmetros de validação. I.
Barthus, Rosângela C. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

*Dedico esse trabalho a Deus, a minha família,
ao Rodrigo e amigos que muito sabiamente e
calmamente me auxiliaram para que eu pudesse
concretizar esse desafio.*

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós graduação em química da Universidade Federal do Espírito Santo pela possibilidade de execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa cedida durante a execução desse projeto.

A Prof^a. Dr^a. Rosângela Cristina Barthus pela orientação, sabedoria, persistência na iniciação dessa linha de pesquisa.

A empresa Nutriave Nutrição Animal por ter fornecido amostras e dados técnicos para o estudo.

Ao Núcleo de Competência em Química do Petróleo pela disponibilidade na utilização do equipamento ICP OES.

A empresa Quimiplan Análise e Consultoria por ter disponibilizado alguns materiais e permitir a execução de alguns testes no ICP OES.

Ao Prof. Dr. Honório Coutinho de Jesus por permitir a utilização de toda estrutura do laboratório de Química Analítica da UFES (LQA).

Ao Prof. Dr. Eloi Alves da Silva Filho pelo auxílio nos documentos para que a UFES disponibilizasse os gases necessários para utilização do ICP OES.

A Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima e seus alunos por todo seu auxílio técnico na área de ICP OES.

A Prof^a. Dr^a. Geisamanda Pedrini Brandão Athayde pelo auxílio técnico e pessoal.

A Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Fontes Lelis por fornecer alguns reagentes e pelo apoio técnico.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de materiais carbonosos e cerâmicos (LMC) pelo empréstimo de gases para testes no ICP OES.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Química Orgânica (do prédio de laboratórios de física e química) pelo empréstimo de materiais e reagentes para execução de testes.

Ao aluno de iniciação científica Felipe Reis pelo auxílio na execução de diversas análises e pelo companheirismo.

Aos amigos que conquistei nessa jornada e aos antigos amigos que me ajudaram tecnicamente e psicologicamente em especial a Thalles Rosa, Gisele Dantas, André Elizário, Fernando Betim, Wanderlei Pratti, Alex Trevilin, Diego Nunes, Cyntia Portella, Renan Matheus, Angélica Siqueira, Roberta Rossi, Leandra Gobira, Vitor Araujo, Demóstenes Amorim, Roberta Cecília Vettoraci e Carliani Dal Piero B. Bessa.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Necessidade de iodo para animais em relação à alimentação	26
TABELA 2 - Expressões para validação do modelo matemático	50
TABELA 3 - Composição dos premixes 1 e 2	65
TABELA 4 - Composição dos premixes 3 e 4	65
TABELA 5 - Testes de solubilização da amostra de premix 1 (comercial)	67
TABELA 6 - Condições operacionais do ICP OES para análise das amostras de premixes	71
TABELA 7 - Procedimentos de extração 1 - 7 seguido da quantificação do iodo por titulação	77
TABELA 8 - Procedimentos de extração 9 - 14 seguido da quantificação do iodo por titulação	78
TABELA 9 - Procedimentos de extração 15 e 16 seguido da quantificação do iodo por titulação	79
TABELA 10 - Procedimento de extração 17 seguido da quantificação do iodo por titulação	80
TABELA 11 - Procedimentos de extração 18 - 21 seguido da quantificação do iodo por titulação	80
TABELA 12 - Procedimento de extração 22 seguido da quantificação do iodo por titulação	81
TABELA 13 - Matriz de contraste do planejamento de experimentos	85
TABELA 14 - Avaliação do modelo da otimização para o iodato	86
TABELA 15 - Avaliação do modelo da otimização para o iodeto	86
TABELA 16 - Teste F para seleção da curva de calibração do método de determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES	92
TABELA 17 - Avaliação da exatidão dos métodos de determinação de iodo nas amostras de premixes simulados	96
TABELA 18 - Avaliação da precisão dos métodos de determinação de iodo nas amostras de premixes simulados	96
TABELA 19 - Recuperações das análises das amostras de premixes comerciais ...	97
TABELA 20 - Desvios das análises das amostras de premixes comerciais	97

TABELA 21 - Condições operacionais do ICP OES para análise das amostras de xaropes	106
TABELA 22 - Resultado da análise das amostras de xaropes comerciais utilizando o método espectrofotométrico UV-VIS	113
TABELA 23 - Teste F para seleção da curva de calibração do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES	115
TABELA 24 - Resultados do ensaio de robustez do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES – estudo do pH	118
TABELA 25 - Resultado das análises das amostras de xaropes comerciais utilizando o método por ICP OES.....	119
TABELA 26 - Comparação dos resultados das amostras de xaropes alcançado pelo método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff e ICP OES	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Elementos analisáveis por ICP OES	37
FIGURA 2 - Temperaturas em várias regiões do plasma	39
FIGURA 3 - Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples	44
FIGURA 4 - Superfície de resposta referente ao fluxo do gás de nebulização e a potência para o iodato	87
FIGURA 5 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração e a potência da amostra para o iodato	87
FIGURA 6 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração da amostra e o fluxo do gás de nebulização para o iodato	87
FIGURA 7 - Superfície de resposta referente o fluxo do gás de nebulização e a potência para o iodeto	88
FIGURA 8 - Superfície de resposta referente taxa de aspiração da amostra e a potência e a para o iodeto	88
FIGURA 9 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração e ao fluxo do gás de nebulização da amostra para o iodeto	88
FIGURA 10 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodato) nas amostras de premixes por ICP OES	93
FIGURA 11 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de premixes por ICP OES	93
FIGURA 12 - Resíduos da curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodato) nas amostras de premixes por ICP OES	94
FIGURA 13 - Resíduos da curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de premixes por ICP OES	94
FIGURA 14 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff	111
FIGURA 15 - Gráfico de resíduos da calibração do método espectrofotométrico...	111
FIGURA 16 - Curvas de calibração externas para o método de ICP OES para análise de medicamento	115
FIGURA 17 - Resíduos da curva de calibração do método de ICP OES para análise de medicamentos	116

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS - Espectrometria de absorção atômica

ACS - Sociedade americana de química

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD - Dispositivo de carga acoplada

CFA-C - Mistura de aminas terciária solúveis em água

CV-AAS - Espectrometria atômica de absorção com geração de vapor a frio

Cm - Concentração média

CV- Coeficiente de variação

DBD OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma gerado por descarga de barreira dielétrica

EDTA - Sal do ácido etilenodiaminotetraacético

F AAS - Espectrometria de absorção atômica em chama

HPLC-UV/vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta visível

IC - Cromatografia iônica

ICP - MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

ICP OES - Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente

ISE - Eletrodo de íon seletivo

LD - Limite de detecção

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCR - Material de referência certificado

MIC - Combustão iniciada por micro-ondas

MQep - Média quadrática do erro puro

MQfaj - Média quadrática da falta de ajuste

MQR - média quadrática da regressão

MQr - Média quadrática dos resíduos

MR - Material de referência

MS - Material seco

NAA - Análise por ativação de nêutrons

P.A. - Para análise

pH- Potencial hidrogeniônico

SBR - Relação sinal fundo

SQep- Soma quadrática do erro puro

SQfaj- Soma quadrática da falta de ajuste

SQR - Soma quadrática da regressão

SQr - Soma quadrática dos resíduos

SQT - Soma quadrática total

TH - Tireóide de Hashimoto

TMAH - Hidróxido de tetrametilamônio

TSH - Hormônio estimulante da tireóide

T4 - Tiroxina

T3 - Triiodotirosina

VUV - Ultravioleta no vácuo

XRF- Espectrometria de fluorescência de raio-x

LISTA DE SÍMBOLOS

g kg⁻¹ - Grama por quilo
mg - Miligrama
mL - Mililitro
nm - Nanômetro
% - Porcentagem
aq - Aquoso
µg - Micrograma
Cm - Concentração média
ME - Matéria seca
°C - Graus celsius
mim - Minutos
v v⁻¹ - Volume por volume
h - Hora
~ - aproximadamente
MPa - Megapascal
bar - Unidade de medida de pressão
kPa - Quilopascal
s - segundo
µg L⁻¹ - Micrograma por litro
mol L⁻¹ - Concentração molar
mmol L⁻¹ - Milimol por litro
m v⁻¹ - massa por volume
K - Kelvin
mm - Milímetro
® - Registrado
ppb - parte por bilhão
V- voltz
A - Absorbância
T - Transmitância
P₀ - Intensidade da radiação antes da cubeta
P - Intensidade após a cubeta

ϵ - Absortividade molar

b - Comprimento do caminho óptico

- α - Menor nível codificado utilizado no planejamento por composto central

+ α - Maior nível codificado utilizado no planejamento por composto central

M - Número de níveis distintos da variável independente

r - Número total de observações

n_i - Número de repetições no nível i

y_i - Resposta obtida nos experimentos

y_{ia} - Resposta esperada

y_m - Valor médio de y_i

y_{iam} - Média do y_i em que a resposta de cada ponto central é a média das respostas nas replicatas

p - Número de parâmetros do modelo

X - Eixo gráfico que representa a concentração de uma curva de calibração

Y - Eixo gráfico que representa o sinal analítico de uma curva de calibração

C1 - Concentração Total do analito na amostra fortificada no ensaio de recuperação

C2 - Concentração do analito na amostra sem fortificação no ensaio de recuperação

C3 - Concentração do analito adicionada no ensaio de recuperação

S - Desvio padrão amostral

Nº - Número

kg T⁻¹ - quilograma por tonelada

ln - Logarítmo neperiano

W - Watt

x_1 - Potência

x_2 - Fluxo do gás de nebulização

x_3 - Taxa de aspiração da amostra

n - Número de repetições

cps - contagem por segundos

RESUMO

O excesso ou a carência do iodo nos organismos humanos e animais pode acarretar modificações nos níveis dos hormônios tireoidianos, gerando variações nas reações celulares, temperatura corpórea, crescimento, e, por conseguinte alterações no metabolismo basal. Portanto deve-se contabilizar o teor de iodo nas principais fontes (alimentos e medicamentos) a fim de se ter um controle das quantidades ingeridas e da qualidade dos produtos. Para isso foi verificada a possibilidade da determinação de iodo em premixes e soluções expectorantes através da aplicação da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e do método espectrofotometria UV-VIS baseado na reação de Sandell-Kolthoff. Visto que o premix se trata de uma amostra complexa foram testados diversos procedimentos de extração de iodo por banho ultrassom obtendo melhor resposta com 20,0000 g das amostras em meio à solução aquosa de citrato de sódio. Os xaropes foram preparados por diluição em meio aquoso. Para o desenvolvimento de método por ICP OES realizou-se planejamento composto central sendo neste caso, estudada a potência, o fluxo de gás de nebulização e a taxa de aspiração da amostra. Em sequência foram realizados testes de avaliação das características de desempenho, obtendo recuperações de 79,0 - 90,8 % para as amostras de premix com iodato, 81,5 - 93,3 % para as amostras de premix com iodeto, já para os xaropes obtiveram as recuperações médias de 101,0 - 104,0 %. O método cinético de Sandell-Kolthoff utilizado foi com medida em tempo fixo, no qual permitiu maior agilidade na análise. Por esta metodologia foi possível realizar análises dos xaropes obtendo 96,3 - 98,2 % de recuperação média, já nos premixes analisados neste estudo houve problemas de interferência nas reações de oxirredução que regem o método, impossibilitando a realização do ensaio. Tais métodos desenvolvidos têm como vantagens a utilização técnicas de preparação de amostra simples e o uso de equipamentos populares para a quantificação do teor de iodo nos premixes e nas soluções expectorantes.

Palavras-chave: ICP OES, espectrofotometria UV-VIS, iodo, parâmetros de validação.

ABSTRACT

The excess or deficiency of iodine in human and animal organisms can cause changes in the levels of thyroid hormones, causing variations in cellular reactions, body temperature, growth, and in consequence alteration in basal metabolism. Therefore is necessary quantify the iodine content of the main sources (food and medicines) in order to have a control of the quantities consumed and product quality. For this, was verified the possibility of iodine determination in premixes and expectorants solutions by applying the technique optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES) and UV-VIS spectrophotometry method based on the Sandell-Kolthoff reaction. Since the premix it is a complex composition sample, was tested various extraction procedures iodine with ultrasound bath, having best response with 20.0000 g of the sample in sodium citrate aqueous solution. The syrups analysis was used dilution with water. For method development by ICP OES held central composite design in which case, studied the power, the flow of nebulizer gas and the rate of aspiration of the sample. In sequence performance characteristics tests were made, obtaining recoveries from 79.0 - 90.8 % for samples with iodate premix, 81.5 - 93.3 % for samples premix with iodide, already on syrups obtained average recoveries of 101.0 - 104.0 %. The kinetic method was used with measurements at fixed time, allowing greater agility in the acquisition of results. By this method it was possible to perform analysis of the syrups obtaining 96.3 - 98.2 % average recovery, already for premixes analyzed in this study there was interference problems in the redox reaction that governing this method, making it impossible the realization this test. Developed such methods have advantages such as techniques using simple sample preparation and the use of popular equipment for the quantification of iodine in premixes and solutions in expectorants.

Keyword:, ICP OES, UV-VIS spectrophotometry, iodine, validation parameters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 A importância do iodo para homens e animais	24
1.2 Determinação de iodo	27
1.2.1 Métodos de preparo de amostra	27
1.2.1.1 <i>Fusão</i>	28
1.2.1.2 <i>Calcinação</i>	29
1.2.1.3 <i>Piroidrólise</i>	30
1.2.1.4 <i>Digestão ácida</i>	31
1.2.1.5 <i>Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)</i>	32
1.2.1.6 <i>Extração/solubilização</i>	33
1.2.1.7 <i>Outras formas de preparo de amostra</i>	35
1.2.2 Técnicas de quantificação.....	35
1.2.2.1 <i>Titulação iodométrica</i>	35
1.2.2.1.1 <i>Determinação de iodo por iodometria</i>	37
1.2.2.2 <i>Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)</i>	37
1.2.2.2.1 <i>Determinação de iodo por ICP OES</i>	41
1.2.2.3 <i>Espectrofotometria UV-VIS</i>	43
1.2.2.3.1 <i>Determinação de iodo por espectrofotometria UV-VIS (Sandell-Kolthoff)</i>	45
1.3 Otimização por meio de planejamento fatorial	47
1.4 Avaliação das características de desempenho dos métodos analíticos ..	51
1.4.1 Faixa de trabalho.....	52
1.4.2 Linearidade	52
1.4.2.1 <i>Sensibilidade</i>	53
1.4.3 Seletividade	54
1.4.4. Exatidão	55
1.4.5 Precisão	55
1.4.5.1 <i>Repetitividade</i>	56
1.4.5.2 <i>Reprodutibilidade</i>	56
1.4.6 Robustez	57

2. OBJETIVO	59
3. DETERMINAÇÃO DE IODO EM AMOSTRAS DE PREMIXES	61
3.1 Parte experimental.....	62
3.1.1 Instrumentação.....	62
3.1.2 Materiais e reagentes	63
3.1.3 Soluções padrão	64
3.1.4 Preparo do material e vidrarias.....	64
3.1.5 Amostras.....	64
3.1.6 Determinação de iodo em amostras de premixes por titulação iodométrica.....	66
<i>3.1.6.1 Testes de preparo da amostra do premix 1 (comercial) usando titulação iodométrica na quantificação.....</i>	<i>66</i>
3.1.7 Determinação de iodo em amostras de premixes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff	69
<i>3.1.7.1 Preparo das amostras de premixes para análise por espectrofotometria UV-VIS com reação Sandell-Kolthoff</i>	<i>70</i>
3.1.8 Determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES.....	70
<i>3.1.8.1 Otimização das condições operacionais do ICP OES para determinação de iodo</i>	<i>72</i>
<i>3.1.8.2 Testes de preparo das amostras do premix 1 com quantificação por ICP OES</i>	<i>72</i>
<i>3.1.8.3 Testes de preparo das amostras do premix 2 com quantificação por ICP OES</i>	<i>73</i>
<i>3.1.8.4 Avaliação da qualidade dos métodos de determinação de iodo em amostras de premixes usando ICP OES</i>	<i>74</i>
3.1.8.4.1 Seletividade.....	75
3.1.8.4.2 Linearidade	75
3.1.8.4.3 Efeito de memória	75
3.1.8.4.4 Robustez do plasma	76
3.1.8.4.5 Exatidão e precisão.....	76
3.1.8.4.6 Análise das amostras	76
3.2 Resultados e discussões	76
3.2.1 Testes de preparo do premix 1 (comercial) por análise titulométrica	76

3.2.2 Determinação de iodo em amostras de premixes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff	81
3.2.3 Determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES	84
3.2.3.1 <i>Otimização das condições operacionais do ICP OES para determinação de iodo</i>	<i>84</i>
3.2.3.2 <i>Testes de preparo da amostra do premix 1 com quantificação por ICP OES.....</i>	<i>89</i>
3.2.3.3 <i>Testes de preparo da amostra do premix 2 com quantificação por ICP OES.....</i>	<i>90</i>
3.2.3.4 <i>Avaliação da qualidade dos métodos de determinação de iodo em amostras de premixes usando ICP OES</i>	<i>91</i>
3.2.3.4.1 Seletividade.....	91
3.2.3.4.2 Linearidade	92
3.2.3.4.3 Efeito de memória	95
3.2.3.4.4 Robustez do plasma	95
3.2.3.4.5 Exatidão e Precisão	95
3.2.3.4.6 Análise das amostras comerciais	97
4. DETERMINAÇÃO DE IODO NAS SOLUÇÕES EXPECTORANTES	99
4.1 Parte experimental.....	100
4.1.1 Instrumentação.....	100
4.1.2 Materiais e reagentes	101
4.1.3 Soluções padrão	101
4.1.4 Preparo do material e vidrarias.....	102
4.1.5 Amostras	102
4.1.6 Determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff	102
4.1.6.1 <i>Preparo das amostras de xaropes para determinação de iodo pelo método espectrofotométrico UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff</i>	<i>103</i>
4.1.6.2 <i>Desenvolvimento de método e avaliação da qualidade do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff.....</i>	<i>104</i>
4.1.6.2.1 Seletividade.....	104
4.1.6.2.2 Faixa de trabalho e linearidade	104

4.1.6.2.3 Exatidão e precisão.....	105
4.1.6.2.4 Robustez.....	105
4.1.6.2.5 Análise das amostras comerciais.....	105
4.1.7 Determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES.....	105
4.1.7.2 <i>Preparo das amostras de xaropes para determinação de iodo pelo método em ICP OES</i>	107
4.1.7.3 <i>Avaliação da qualidade do método determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES</i>	107
4.1.7.3.1 Seletividade.....	107
4.1.7.3.2 Linearidade.....	108
4.1.7.3.3 Efeito de memória.....	108
4.1.7.3.4 Robustez.....	108
4.1.7.3.5 Exatidão e precisão.....	108
4.1.7.3.6 Análise das amostras.....	109
4.2 Resultados e discussões.....	109
4.2.1 Determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff.....	109
4.2.1.2.1 Seletividade.....	110
4.2.1.2.2 Faixa de trabalho e linearidade.....	110
4.2.1.2.3 Exatidão e precisão.....	112
4.2.1.2.4 Robustez.....	112
4.2.1.2.5 Análise das amostras comerciais.....	113
4.2.2 Determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES.....	113
4.2.2.1 <i>Avaliação da qualidade do método determinação de iodo em amostras de xaropes usando ICP OES</i>	114
4.2.2.1.1 Seletividade.....	114
4.2.2.1.2 Linearidade.....	115
4.2.2.1.3 Efeito de memória.....	117
4.2.2.1.4 Robustez.....	117
4.2.2.1.5 Exatidão e precisão.....	118
4.2.2.1.6 Análise das amostras comerciais.....	118
4.3 Comparação dos métodos.....	119
5. CONCLUSÕES.....	122

6. REFERÊNCIAS.....	125
----------------------------	------------

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O iodo é um micronutriente essencial para síntese dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), que são produzidas na tireoide. Essas substâncias são importantes para a manutenção de uma série de processos bioquímicos reguladores do funcionamento de diversos órgãos de animais que possuem essa glândula, incluindo os seres humanos.¹

Nos organismos dos animais e dos humanos o iodo provém principalmente da ingestão de água, alimentos e medicamentos. No caso dos animais de produção ou estimação, há um destaque para o uso dos premixes que consiste em uma pré-mistura de aditivos para fabricação de ração, fonte esta contendo iodo em níveis variando em torno de $1000,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Nos humanos é comum a administração de xaropes expectorantes que contém iodo em torno de $76,45 \text{ mg}$ a cada 5 mL do produto.^{2,3}

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os órgãos nacionais responsáveis pelo controle da fabricação e venda dos produtos relativos à alimentação animal e a medicamentos humanos, respectivamente. Essas instituições geraram leis e instruções normativas que exigem das empresas produtoras, uma série de estudos a fim de garantir a eficácia e qualidade dos produtos. Para suprir a demanda do mercado é importância realizar trabalhos relativos ao desenvolvimento de métodos de determinação de iodo em amostras de premixes e xaropes.^{4,5}

Existem poucos trabalhos que relatam a determinação de iodo devido à dificuldade, principalmente no que se refere ao preparo das amostras, pois essa etapa é uma das mais críticas da análise por geralmente conter muitas operações, demandando tempo e estando sujeita a ocorrência de diversos erros, como a perda do analito por volatilização.⁶ Portanto o que se têm usado com melhores resultados para análise de amostras com iodeto e iodato em meios inorgânicos ou com matéria orgânica são extrações alcalina ou aquosa^{6,7-9}, para amostras contendo iodo (orgânico ou iodeto) em meio a grande quantidade de matéria orgânica são digestões e combustões completa em micro-ondas^{10,11} e amostras contendo iodato de cálcio é a piroidrólise^{11,12}.

Há uma grande diversidade de métodos de determinação de iodo, e para selecionar o mais adequado deve-se observar a complexidade das amostras, o teor e a espécie químicos do analito. Os métodos mais utilizados são baseados nas técnicas de titulação¹³, espectrofotometria UV-VIS^{13,14}, análise por ativação de nêutrons (NAA)¹⁵, espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)⁶, espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)¹⁶, por cromatografia⁹, voltametria¹⁷ e espectrometria de fluorescência de raio-x (XRF)¹⁸.

Dentre as determinações titulométricas existe a iodometria que se baseia na reação de oxirredução entre o iodo gerado no meio e o enxofre do titulante tiosulfato de sódio.¹³ O ponto de viragem pode ser identificado pela descoloração do complexo do iodo/amido ou através de uma grande diferença de potencial identificada em um titulador automático. Esse método tem como característica a possibilidade da quantificação de iodo exclusivamente na forma de iodato, tendo rapidez na execução, baixo custo e altos limites de detecção se comparados com métodos desenvolvidos pelas técnicas mais usadas em quantificação de iodo, como NAA, e ICP-MS.

Em meio às determinações espectrofotométricas há destaque para os métodos cinéticos baseados na reação de Sandell-Kolthoff que consiste na determinação indireta do iodeto que age como catalisador sobre a reação de oxirredução entre o Ce^{4+} e As^{3+} . A mistura é amarela devido à presença do íon Ce^{4+} , que ao diminuir sua concentração diminui também a intensidade da coloração. Esse método possui moderado custo e complexidade e já foi usado para análise de diversas amostras, tais como urina, água, soro sanguíneo e alguns alimentos.^{14,19,20,21}

A técnica de ICP OES é bastante vantajosa com relação a outras técnicas de quantificação elementar, uma vez que este equipamento é encontrado em muitos institutos de pesquisa e empresas, principalmente devido a grande aplicabilidade, a possibilidade de análise multielementar e uma ampla faixa de concentração. A ICP OES permite a quantificação de halogênios principalmente em linhas na faixa do vácuo ultravioleta (abaixo de 190 nm) gerando altos limites de detecção e quantificação se comparado com a determinação de metais, logo deve-se realizar

estudos de interferentes, visando a minimização e a otimização dos parâmetros instrumentais para obter uma condição com maior sinal analítico.^{6,22,23}

Para avaliar a qualidade analítica dos métodos desenvolvidos é importante analisar alguns parâmetros de validação, tais como: seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez.²⁴

1.1 A importância do iodo para homens e animais

O iodo está presente em diversas matrizes. No meio ambiente é achado sobretudo nas águas e nos solos, estando ligado a compostos orgânicos ou em sais de iodato e iodeto.^{14,25}

Esse elemento também é encontrado em diversos produtos devido à ação antisséptica e desinfetante, estando em especialmente como Iodopovidona.²⁶⁻²⁹

Nos alimentos ele pode ser encontrado nos peixes, frutos do mar, algas, hortaliças, ovos, leites e seus derivados estando na forma de iodeto ou iodo orgânico.^{30,31,32} O consumo desses alimentos não tem sido suficiente para suprir as necessidades de iodo, levando diversos países a adotarem a adição de iodato de potássio, iodeto de potássio ou de sódio no sal comestível.^{34,34}

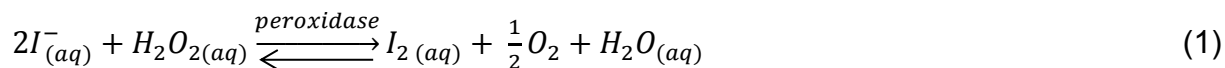
Na alimentação animal o iodo é disponível em folhagens, estando na forma de iodeto livre ou ligado a moléculas orgânicas. Também se faz uso de rações tendo adição desse nutriente através dos premixes, por meio de iodeto de potássio ou iodato de cálcio.^{35,36}

Esse nutriente também é encontrado em diversos suplementos e medicamentos e dentre eles há uma grande utilização em humanos das soluções expectorantes contendo iodeto de potássio.^{37,38,39}

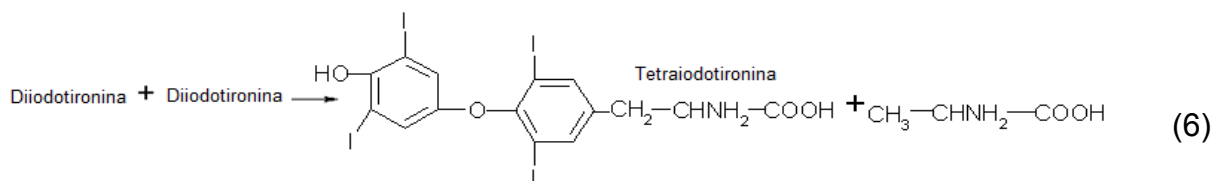
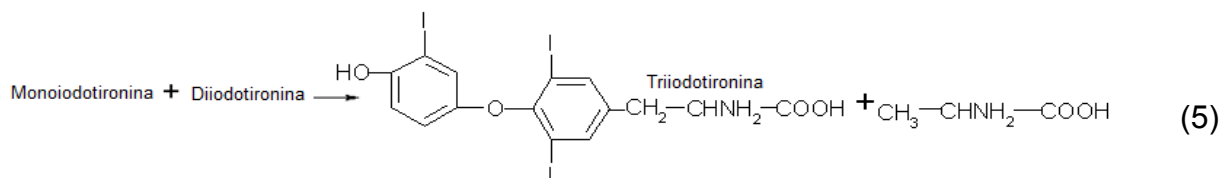
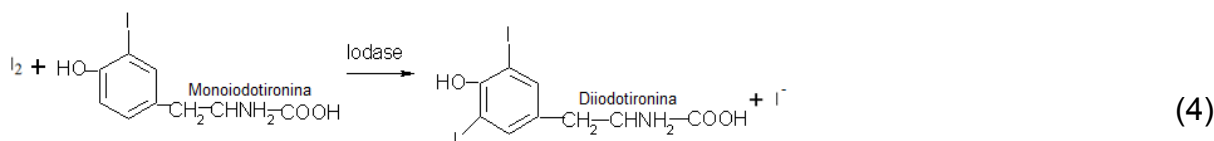
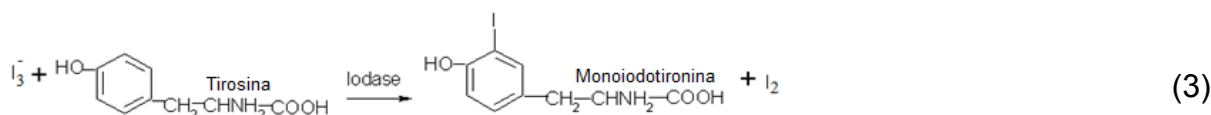
O iodo existente nos homens e animais é ingerido oralmente, sendo rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. No caso dos humanos, o intestino é o local de maior absorção.⁴⁰

Ainda no sistema gastrointestinal o iodato e o iodo orgânico são convertidos a iodeto, com exceção do iodo ligado a proteínas que não é convertido e é lentamente absorvido. O iodeto segue para os tecidos e órgãos através do sangue, e 70-80 % do iodo nos organismos se instalam na tireóide.⁴¹

Na tireoide ocorre inicialmente as reações 1 e 2 modificando a forma química do iodeto para que possam participar das sínteses hormonais.⁴²



Posteriormente ocorrem as reações 3, 4, 5 e 6 que se referem à molécula do aminoácido tirosina reagindo com o iodo para formar a monoiodotirosina que pode reagir novamente com o iodo formando a diiodotirosina e a associação dessas moléculas produzem os hormônios triiodotironina (T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4).⁴⁰



Após a síntese, as moléculas de T3 e T4 vão para a corrente sanguínea onde são enviados a diversas partes do corpo para exercerem suas funções, sendo a principal delas a regulação das reações metabólicas. Pode-se concluir que no sangue há iodetos e iodo na forma orgânica.⁴²

O fígado elimina iodeto e iodotironinas inatas e a maioria vai para o intestino onde podem ser novamente absorvidos. A taxa de reciclagem depende do bom funcionamento da tireoide.⁴³

Cerca de dois terços do iodo absorvido é filtrado e excretado pelos rins na forma de iodeto ou iodotironinas após desalogenização, liberando-os pelas fezes e urina e a quantidade eliminada dependem da quantidade ingerida.⁴⁰

As necessidades desse nutriente para os seres humanos dependem da idade e do estágio fisiológico, variando de acordo com os autores, sendo entre 40-200 µg por dia.⁴⁴ Nos animais as necessidades variam de acordo com a ordem, sendo conhecida as quantidades que devem conter nos alimentos, como é demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1 - Necessidade de iodo para animais em relação à alimentação

Animal	Quantidade requerida (mg kg⁻¹)
Bovinos de corte	0,30 em MS*
Frangos de corte	0,4 em MS*
Galinhas em postura	0,32 – 0,48 em MS*
Perus	0,50 em MS*
Porcas reprodutoras	0,50 – 0,60 em MS*
Suínos em engorda	0,15 em MS*
Vacas em lactação	0,50 em MS*

Fonte: Flachowsky (2007)⁴⁴

*material seco

Vale destacar que as necessidades desse micronutriente são maiores em período gestacional e de produção de leite, chegando ao caso de mulheres a 260 µg por dia.⁴⁴

Visto que a absorção de iodo nos organismos humanos e animais que contem a tireoide são semelhantes, os distúrbios relativos ao consumo acima e abaixo dos níveis indicados também são similares.

A falta do iodo nos organismos geralmente ocasiona baixa produção dos hormônios tireoidianos, doença conhecida como hipotireoidismo. Esse problema pode ocasionar bócio que se refere ao inchaço da tireoide ao sofrer ação excessiva do hormônio estimulante da tireóide (TSH) liberado, a fim de aumentar a atividade dessa glândula. O hipotireoidismo congênito pode causar má formações no feto e cretinismo humano, doença esta que gera retardo mental.⁴²

O excesso de iodo comumente causa o aumento da produção dos hormônios tireoidianos (hipertireoidismo) e alguns tipos de tiroxicoses.⁴⁵ Visto a diferença fisiológica de animais de espécies e raças diferentes, ainda não é bem definido as consequências da abundância de T3 e T4, reforçando a necessidade do desenvolvimento de metodologias para a determinação do teor de iodo em diversas matrizes, facilitando a concretização de tais pesquisas.⁴⁶

Há trabalhos recentes demonstrando que a ingestão exagerada de iodo também pode causar tireoidite de Hashimoto (TH), enfermidade na qual o organismo fabrica anticorpos contra as células tireoidianas.⁴⁷ Outros estudos retratam que o consumo exacerbado desse elemento durante o período de gestação e lactação pode tornar a prole mais propensa a sofrer de hipotireoidismo na vida adulta.⁴⁸

A falta e o excesso de iodo estão principalmente relacionados às mudanças dos teores de T3 e T4, causando problemas nas atividades que dependem dessas substâncias, tais como: regulação do consumo de energia, consumo de oxigênio, metabolismo de diversos nutrientes como a vitamina C, síntese de algumas proteínas, metabolismo de carboidratos e lipídeos, absorção de água nas células, desenvolvimento sexual, desenvolvimento de tecidos nervoso, entre outros.^{2,42}

1.2 Determinação de iodo

1.2.1 Métodos de preparo de amostra

Essa é uma das etapas mais críticas da análise, uma vez que são realizadas muitas operações podendo gerar alguns erros, tais como a formação de HI e I₂ possibilitando perdas de iodo devido à volatilização ou por absorção/adsorção em diversos materiais como teflon, polipropileno, alumina, platina e vidro, gerando efeito de memória em ICP OES e ICP-MS. Portanto no caso do iodo, evita-se o preparo das amostras e soluções padrões em meios ácidos, pois a maioria destes favorece a conversão do analito para as formas voláteis.^{6,49-51}

As técnicas de preparo devem ser selecionadas de acordo com a complexidade da amostra e a espécie química do analito. Os métodos demonstrados a seguir são os mais utilizados ou que possuem maior potencial para

serem utilizadas em conjunto com as técnicas de determinação espectrofotométricas de Sandell-Kolthoff e ICP OES.

1.2.1.1 Fusão

Esse método de decomposição tem sido usado em preparo de amostras para determinação de iodo e consiste na reação da amostra sólida com um fundente a altas temperaturas, transformando a estrutura da amostra de forma que ela possa ser analisada diretamente por espectrometria de fluorescência de raio-x (XRF).⁵² A nova estrutura sólida pode ser dissolvida em meios ácidos, neutros ou alcalinos, dispondo o analito em forma de solução, permitindo também a quantificação em diversas técnicas como ICP OES, ICP-MS, espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS), entre outras.⁵³

A escolha do fundente é de acordo com a composição da amostra e o pH, portanto amostras ácidas pedem fundentes alcalinos e vice-versa.⁵²

A técnica de decomposição por fusão é usada em amostras que não são dissolvidas em ácidos concentrados a quente, ou são atacados lentamente e/ou dissolvidos parcialmente. Também é empregada em amostras com analitos que se volatilizam em contato com ácidos fortes, como é o caso do iodo.⁵³

Hoehne (2011)⁵² tentou determinar halogênios (F, Br, Cl e I) em alumina testando dois tipos de fundente o $K_2S_2O_8$ e o $Na_2B_4O_7$ isoladamente. Nos procedimentos variou-se a massa dos fundentes, permanecendo em mufla a 500 °C por 30 min. Os sólidos resultantes foram dissolvidos com solução de HNO_3 5 % (v v⁻¹), porém houve a formação de grande quantidade de suspensão que prejudicou a quantificação dos analitos pelas técnicas ICP-MS, ICP OES e cromatografia iônica (IC).

Brown, *et al.* (2005)⁴⁹ determinaram o teor de iodo em amostras de sal culinário, materiais de referência de solo e materiais de referências certificados de iodo, através do procedimento de fusão, testando diversas massas das amostras e usando mistura das soluções de KOH e KNO_3 . O conjunto (amostra + soluções) foram levadas a mufla a 550 °C por 1 h. Os sólidos resultantes foram dissolvidos

com água purificada, e o sólido residual no cadinho foi dissolvido com solução de H_2SO_4 e bissulfito de sódio, seguido da determinação por ICP-MS.

Date e Stuart (1988)⁵⁴ determinaram halogênios (I, Cl, Br) em material particulado testando diversos procedimentos de preparo das amostras e dentre tais foram realizadas a fusão da amostra com carbonato de sódio. Após a fusão o sólido foi dissolvido em água a quente e o resíduo do cadinho foi dissolvido em solução de ácido nítrico. A análise quantitativa foi realizada em ICP-MS, no qual produziu resultados próximos aos esperados.

Esta técnica de preparo de amostra tem sido bastante utilizada na determinação de iodo por meio de NAA.⁵⁵⁻⁵⁷

1.2.1.2 Calcinação

A calcinação é usada para amostras orgânicas, quando se deseja eliminar carbono, uma vez que ele interfere em alguns métodos como no espectrofotométrico de Sandell-kolthoff, pois existem evidências de que o carbono absorve o complexo colorido. Nas técnicas de ICP OES e ICP-MS, compostos com carbono entram em combustão quando estão em contato com o plasma, diminuindo a quantidade de energia da fonte de atomização/ionização.²¹

Mashesh *et al.* (1992)²¹ analisaram iodo em diversos tipos de alimentos pelo método de Sandell-kolthoff. As amostras foram pesadas (50-100 mg) seguido de dois passos de calcinação, o primeiro com uma solução de KOH e o segundo com solução de ZnSO_4 , ambos a 600 °C totalizando 1-3 h dependendo do teor de matéria orgânica da amostra. Foi citado que em alguns casos a incineração utilizando solução de KOH e solução Na_2CO_3 isoladamente não foram suficientes, havendo realmente necessidade dos dois passos de calcinação como realizado neste trabalho.

Niedobová *et al.* (2005)⁵⁰, determinaram iodo em leite pela geração de vapor de iodo e quantificação por ICP OES demonstrando todo o preparo da amostra que consistiu em cerca de 200 mg ou 2 mL de qualquer tipo de leite, adicionou-se uma solução de KOH em etanol e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ em etanol, realizando a calcinação com aumento gradual da temperatura até 640 °C, totalizando 10 h de aquecimento.

Adicionou-se nas cinzas alíquotas de soluções de sulfito de sódio e ácido clorídrico bastante diluído promovendo um aquecimento para eliminação de dióxido de carbono residual. A solução resultante foi diluída com água.

Wifladt e Lund (1989)⁵⁸ quantificaram o iodo em algas pelo método indireto baseado na reação entre iodeto e mercúrio (II), com determinação deste metal por espectrometria atômica de absorção com vapor a frio (CV-AAS). As amostras foram levadas a mufla com hidróxido de sódio e álcool tendo um aquecimento gradual até 600 °C, em um total de 80 min. As cinzas foram solubilizadas em água a quente.

A calcinação alcalina foi bastante usada na quantificação de iodo em amostras com matéria orgânica^{53,59-62}, porém tem sido substituída por técnicas que geram melhores resultados de exatidão, precisão e velocidade na análise, tais como extrações, digestões e combustões por micro-ondas.

1.2.1.3 Piroidrólise

Essa técnica consiste na hidrólise de alguns elementos a altas temperaturas (~1000 °C) e na presença de vapor de água. No caso dos halogênios, o aquecimento favorece a formação de ácidos voláteis, nos quais são facilmente hidrolisados e os vapores com o auxílio de um gás inerte são enviados para um condensador onde os analitos são recolhidos em uma solução absorvedora. Para eficiência da técnica se faz necessário a montagem de um sistema bem vedado e com materiais que não absorvam/adsorvam os compostos gerados.⁵³

A piroidrólise é mais utilizada em amostras inorgânicas e tem sido pouco aplicada no preparo de amostras para determinação de iodo, mas tem apresentado bons resultados para outros halogênios.⁶³⁻⁶⁶

Nestes procedimentos são utilizadas pequenas massas de amostra (menos de 1 g) e frequentemente são usados aceleradores que favorecem a liberação do analito. Os mais comuns são óxidos ácidos, tendo destaque V_2O_5 no caso de determinações de iodo.^{12,52,53,64,67,68}

Talfick *et al.* (2012)¹² determinaram o teor de iodo na forma de iodato de cálcio em suplemento animal por ICP-MS e para isso realizou-se procedimento de

piroidrólise que consistiu no uso de 30-150 mg da amostra, argônio como gás carreador, V_2O_5 como acelerador e solução $Na_2CO_3/NaHCO_3$ como absorvedor.

Hoehne (2011)⁵² utilizou ICP-MS na determinação de iodo em alumina de alta pureza preparada através de piroidrólise. O procedimento de preparo de amostra foi otimizado usando 0,20 g da amostra, ar comprimido como carreador, V_2O_5 como acelerador e $(NH_4)_2CO_3$ como solução absorvedora. Encontrou-se cerca de 95 % do iodo adicionado na amostra, mostrando adequação com o resultado encontrado pelo método de combustão por micro-ondas (MIC).

1.2.1.4 Digestão ácida

A digestão refere-se à decomposição da amostra neste caso pelo ataque de ácidos (substâncias oxidantes) a quente, utilizando principalmente as chapas, blocos digestores e fornos micro-ondas. Especialmente nas determinações de elementos que podem ser perdidos por volatilização como os halogênios (com exceção do flúor), As, B, Hg, P, S, Sn, Te, são realizadas procedimentos em sistemas fechados.⁵³

As digestões ácidas usadas na quantificação de halogênios são comumente realizadas em fornos micro-ondas que permitem o máximo de pressão em torno de 20 bar (pressão moderada) e temperatura em torno de 180 °C.⁶⁹

Os ácidos são largamente utilizados nos preparos de amostra na decomposição de materiais orgânicos e solubilização de sais inorgânicos, porém estes procedimentos não são muito indicados no caso de determinação de iodo por favorecer a formação de compostos voláteis.^{6,69} Mesmo com tal problema estes métodos têm sido utilizados⁷⁰⁻⁷⁴, principalmente em amostras de urina por conseguir eliminar os interferentes que podem atrapalhar a quantificação^{70,75-77}.

Eckhoff e Maage (1997)⁷⁸ determinaram o teor de iodo em verduras, peixes e chá através da digestão com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em forno micro-ondas com programa de cinco passos chegando até 650 W e 30 bar. Após esta etapa, as amostras foram diluídas em solução de NH_3 para minimizar as perdas do analito e as quantificações foram realizadas por ICP-MS, utilizando tório como padrão interno.

Dunn *et al.* (1993)⁷⁹ determinaram iodo inorgânico na urina através da digestão das amostras em meio de ácido clorídrico em bloco digestor a 110-115 °C por 60 min, seguindo da análise pelo método de Sandell-Kolthoff. Foram realizadas análises de doze amostras e comparado os resultados com um laboratório de referência.

Murillo *et al.* (2005)⁸⁰ quantificaram iodo em glândulas tireoides humanas, e para isso usou-se 0,05-4,00 g do tecido com água e ácido nítrico seguindo da digestão em forno micro-ondas em vaso fechado chegando a pressão máxima de 1172 kPa, finalizando o programa de aquecimento em 32 min. O analito foi determinado pelo método de Sandell-Kolthoff.

1.2.1.5 Combustão iniciada por micro-ondas (MIC)

A combustão em micro-ondas é utilizada geralmente quando os sistemas convencionais de digestão úmida não são suficientes para efetuar a decomposição total da amostra, além de possuir a vantagem do baixo consumo de amostras e reagentes gerando pouca diluição e contaminação. Vale a pena destacar que os frascos utilizados são fechados, auxiliando também na minimização da perda.

Para essa técnica se faz uso de um recipiente de quartzo o qual a amostra a seco é depositada e ligado a ele há um tubo também de quartzo onde é adicionada a solução absorvedora. Faz-se uso de um fluxo de gás oxigênio com alta pureza sendo este o combustível, permitindo decompor as amostras com baixo nível de contaminação e com pressões aproximadamente 80 bar com a temperatura de ignição cerca de 280 °C. Existem sistemas que permitem o preparo de mais de uma amostra simultaneamente, mas não em grandes quantidades como o forno micro-ondas em sistema de digestão.^{81,82}

O uso de reagentes alcalinos nos procedimentos de combustão ou digestão para determinação de iodo é mais vantajoso pela manutenção dos analitos em solução.¹² Os reagentes mais usados neste caso são o hidróxido de tetrametilamônio (TMAH)^{10,83}, mistura de aminas terciária solúveis em água (CFA-C)⁸⁴, nitrato de amônio⁸⁵⁻⁸⁷, hidróxido de amônio^{88,89} e carbonato de amônio^{85,87}.

Flores *et al.* (2008)⁸⁵ determinaram cloro, bromo e iodo em carvão por ICP-MS, ICP OES e cromatografia de íons (IC) e flúor que foi determinado por eletrodo

de íon seletivo (ISE) e IC. O preparo das amostras se fizeram pelo uso de 500 mg com as soluções absorvedoras de carbonato e nitrato de amônio seguindo da combustão por micro-ondas com oxigênio a 2 MPa a 280 °C, durante 60 s, com 5 min de refluxo e 20 min de resfriamento.

Mesko *et al.* (2010)¹⁰ desenvolveram um método de determinação de iodo em alimentos com o uso de 500 mg das amostras seguindo de combustão induzida por micro-ondas com 15 bar de O₂ a 25 min. Avaliou-se o uso de solução de TMAH, carbonato de amônio, peróxido de hidrogênio e água como absorvedores e em nitrato de amônio como auxílio na ignição, seguido de determinação por ICP-MS.

Hartwig *et al.* (2011)⁸⁷ testaram dois métodos de preparo de amostra para subsequente determinação de iodo em algas por ICP-MS. A combustão consistiu no uso de nitrato de amônio como auxílio para a ignição e o carbonato de amônio como absorvedor a 80 bar de O₂, 280 °C durante 5 min, seguindo de 20 min de resfriamento. Para comparação foi realizada a extração em bloco digestor com TMAH e também com carbonato de amônio a 90 °C durante 3 h. Em ambos os métodos utilizou-se cerca de 400 mg das amostras. O procedimento de MIC mostrou ser melhor por gerar resultado do material de referência certificado mais próximo ao valor referenciado.

1.2.1.6 Extração/solubilização

As extrações ou solubilizações com e sem aquecimento são utilizadas quando não se faz necessária a digestão completa da amostra e tais métodos são escolhidos dependendo do teor e solubilidade do analito. Para o aquecimento são utilizados estufas de secagem, chapas aquecedoras, forno micro-ondas ou banho ultrassom.

Frequentemente utiliza-se nas extrações grandes massas da amostra (1-50 g) e para melhorar a solubilização do analito faz-se uso de banho ultrassônico. Nos equipamentos modernos é possível selecionar a temperatura do meio, a frequência da onda e o tempo de execução do procedimento, já em equipamentos mais simples as condições são fixas.

Quando o analito é bastante solúvel no meio ou solvente usado é comum a realização apenas de diluição ou dissolução.

Os reagentes mais usados nestes tipos de procedimentos são água^{7,34,91-92}, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH)^{16,93}, CFA-C⁶, cloreto de hexadeciltrimetilamônio (HDTA)⁹ e hidróxido de potássio⁹³.

Woollard e Indyk (2014)⁹ determinaram o teor de iodo em premix contendo iodeto de potássio, através da extração em banho ultrassom usando HDTA, durante 30 min a 40 °C. As análises foram realizadas em cromatografia líquida com detector eletroquímico e foi identificada a necessidade do uso de 25 g da amostra para preparo, minimizando problemas de heterogeneidade.

Mary, Balasubramanian e Nagaraja (2008)⁸ determinaram a concentração de iodo em amostras de sal de cozinha e medicamento através de dissolução em meio aquoso, sendo necessária para os sais iodados a redução prévia do analito para iodeto. As quantificações foram realizadas por um novo método espectrofotométrico que se baseia na diminuição da coloração do vermelho de metila ao reagir com o cloreto de iodo gerado através da reação de iodeto com iodato em meio ácido com cloretos. O método apresentou bom resultados ao ser comparado com um método já validado.

Sullivan e Zywicki (2012)¹⁶ desenvolveram um método de determinação de iodo em diversos alimentos incluindo suplementos orgânicos, ou seja, matriz similar ao premix. Foram usados cerca de 5,0 g das amostras em solução de KOH sendo realizada extração em forno micro-ondas com sistema aberto e com bloco digestor. Após a abertura dos frascos foram adicionadas solução estabilizante contendo tiosulfato de sódio e hidróxido de amônio, seguindo de diluição, filtração e determinação por ICP-MS.

Allain *et al.* (1990)⁹⁴ determinaram o teor de bromo e iodo em urina e sangue por diluição em solução de ácido nítrico 1 % (v v⁻¹) e análise por ICP-MS. Para compensar os interferentes da matriz foi utilizada curva de calibração com equiparação de matriz.

Outro tipo de reagente utilizado nos procedimentos de preparo de amostras para análises elementar são os agentes complexantes como citrato de sódio⁹⁵, citrato de amônio⁹⁵ e o sal do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)⁹⁶. Tais reagentes podem ser usados nas extrações, principalmente quando o contra íon do

íon do analito dificulta a sua solubilização sendo possível reagir-lo (complexando-o) a fim de solubilizar o íon de interesse.

1.2.1.7 Outras formas de preparo de amostra

Naozuka *et al.* (2003)²³ desenvolveram métodos de quantificação de cloro, bromo e iodo em leite através da digestão ácida da amostra seguindo da reação com solução de nitrato de prata provocando a precipitação do AgCl, AgBr e AgI e solubilização de tais compostos em solução de hidróxido de amônio seguindo da determinação direta da solução por ICP OES. Testaram a digestão das amostras em micro-ondas em vaso fechado e aberto, porém para o iodo obteve-se melhores recuperações e desvio padrões para o sistema fechado.

Pino, Fang e Braverman (1996)⁹⁷ determinaram iodeto em urina pela substituição do ácido clorídrico usado no método clássico por persulfato de amônio. As amostras de urina com a solução de persulfato de amônio foram mantidas em aquecimento a 90-95 °C por 30 min. e após a retirada e o arrefecimento das misturas foram realizadas as determinações pelo método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff.

1.2.2 Técnicas de quantificação

Várias técnicas podem ser aplicadas na determinação do iodo e os métodos desenvolvidos possuem variações quanto à espécie química do analito, a influência de alguns íons que podem interferir no ensaio, e as figuras de mérito geradas.^{6,13,14,17,19,23,60,90}

1.2.2.1 Titulação iodométrica

Os métodos de titulação por oxirredução podem ser usados para determinação de elementos que variam o nox, sendo divididos em métodos oxidimétricos e redutimétricos.⁹⁸

A iodometria refere-se aos métodos indiretos em que os analitos são agentes oxidantes e reagem com íons iodeto (adicionados em excesso no meio) ocorrendo a formação de iodo (I_2). Essa molécula gerada é reduzida a iodeto através da reação com o titulante. Portanto, os métodos se baseiam na reação 7.¹³



Como o iodo gerado se encontra em meio contendo iodeto ocorre a formação de íons triiodeto (I_3^-), porém tal reação não interfere significativamente o método, pois a reação 8, produz potencial similar ao da reação 7 (I_2/I^-).⁹⁸



Esses métodos podem ser realizados de modo automático por utilização de eletrodos que identificam o ponto de viragem ou através da titulação manual, utilizando o amido como indicador.

O amido utilizado como indicador não possui amilopectina, pois essa substância forma complexo violeta permanente com o iodo. No indicador, portanto, há amilose que forma complexo azul com iodo que por conversão do iodo a iodeto ocorre quebra do complexo e mudança da coloração para incolor.¹³

A iodometria está contida no grupo de métodos de titulação oxidimétricos, pois ocorre a oxidação do titulante (reação 9), e a substância mais utilizada com essa função é o tiosulfato de sódio.¹³



Esses métodos podem ser usados na determinação do teor de peróxido de hidrogênio em águas oxigenadas comerciais, teor de hipoclorito em águas sanitárias, teor de vitamina C em comprimidos efervescentes, entre outros.^{13,99}

1.2.2.1.1 Determinação de iodo por iodometria

Por ser relativamente de simples execução há poucos artigos que retratam essa utilização.

A aplicação da iodometria tem sido retratada na determinação dos teores de iodo na forma de iodato no sal de cozinha. As amostras foram dissolvidas em meio aquoso e análise foi realizada com solução de tiosulfato de sódio como titulante e amido 1% (m v^{-1}) como indicador.^{100,101}

Este método possui baixo custo, rápida execução e moderada dificuldade de execução. É aplicado para determinação de iodo na forma de iodato e em altas concentrações, além de possuir menos precisão que os métodos instrumentais.

1.2.2.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

Essa técnica analítica é relativa e objetiva a análise qualitativa ou quantitativa de elementos químicos principalmente em níveis traços, sendo realizada a leitura monoelementar ou multielementar tanto no modo simultâneo ou sequencial, com uma ampla faixa linear.¹⁰² A Figura 1 apresenta uma tabela periódica com destaque para os elementos possíveis de serem analisados por ICP OES e os dados médios referente aos limites de detecções instrumentais.¹⁰³

1 H																		2 He	
3 Li 670,784 I	4 Be 313,107 II											5 B 249,772 I		6 C 193,030 I	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
11 Na 589,592 I	12 Mg 280,271 II	51 Sb 206,836 I	número atômico, elemento comprimento de onda estado de ionização										13 Al 396,153 I		14 Si 251,611 I	15 P 213,617 I	16 S 180,669 I	17 Cl 725,670 I	18 Ar
19 K 766,490 I	20 Ca 393,366 II	21 Sc 361,383 II	22 Ti 334,940 II	23 V 290,880 I	24 Cr 267,716 II	25 Mn 257,610 II	26 Fe 238,204 II	27 Co 228,616 II	28 Ni 231,604 II	29 Cu 327,393 I	30 Zn 206,200 II	31 Ga 417,206 I	32 Ge 265,118 I	33 As 188,979 I	34 Se 196,026 I	35 Br 863,866 I	36 Kr		
37 Rb 780,023 I	38 Sr 407,771 II	39 Y 371,029 II	40 Zr 343,823 II	41 Nb 309,418 II	42 Mo 202,031 II	43 Tc 249,677 II	44 Ru 240,272 II	45 Rh 343,489 I	46 Pd 340,458 I	47 Ag 328,068 I	48 Cd 228,804 I	49 In 230,606 I	50 Sn 189,927 II	51 Sb 206,836 I	52 Te 214,281 I	53 I 178,215 I	54 Xe		
55 Cs 455,531 I	56 Ba 455,403 II	57 La 408,672 II	58 Hf 264,141 II	59 Ta 226,230 II	60 W 207,912 II	61 Re 197,248 I	62 Os 228,226 II	63 Ir 224,268 II	64 Pt 214,423 I	65 Au 267,595 I	66 Hg 194,168 II	67 Tl 190,801 II	68 Pb 220,353 II	69 Bi 223,061 I	84 Po	85 At	86 Rn		
87 Fr	88 Ra	89 Ac																	
58 Ce 413,764 II	59 Pr 414,311 II	60 Nd 406,109 II	61 Pm	62 Sm 442,434 II	63 Eu 381,967 II	64 Gd 342,247 II	65 Tb 350,917 II	66 Dy 353,170 I	67 Ho 345,600 I	68 Er 337,271 I	69 Tm 313,126 II	70 Yb 328,937 II	71 Lu 261,542 II						
90 Th 283,730 II	91 Pa 385,958 II	92 U 385,958 II	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr						

Limites de detecção

<0.1ppb

0.1-1.0ppb

1.0-10.0ppb

>10.0ppb

FIGURA 1 - Elementos analisáveis por ICP OES

Fonte: http://www.groco.is/groco/upload/files/manualar_fra_birgjum/pe/icp_7_mai_2008/gde_inorganicanalysis.pdf.¹⁰³

As amostras geralmente são analisadas na forma líquida ou preparadas na forma de solução e é bastante utilizada a introdução de amostra clássica que consiste na aspiração da solução por mangueiras com o auxílio da bomba peristáltica, transformação da amostra em uma névoa utilizando um nebulizador, seleção da porção nebulizada através da câmara de nebulização e em sequência inserção do nebulizado no plasma. Existem diversos tipos de nebulizadores e câmaras de nebulização e esse conjunto é selecionado de acordo com as características da amostra e dos reagentes utilizados no preparo.¹⁰⁴

O plasma acoplado indutivamente (ICP) é uma fonte de energia utilizada em aplicações analíticas sendo constituído por um gás parcialmente ionizado contendo elétrons livres e íons excitados. O plasma é formado na tocha de quartzo e essa peça é constituída por três canais em que a seção anular interna recebe um fluxo da amostra geralmente nebulizada, a seção anular intermediária recebe o gás auxiliar responsável por estabilizar o plasma e resfriar a tocha, e a seção anular externa recebe o gás usualmente argônio para formação e manutenção do plasma.¹⁰²

Envolvendo parte do plasma há uma bobina de indução de cobre resfriada internamente com água ou gás e quando uma corrente elétrica gerada pelo circuito incide sobre esse componente há a formação de um campo magnético orientado. Próximo à entrada do gás principal (formador do plasma) há uma bobina de tesla e juntamente com o contato de cobre inserido na tocha há a geração de uma descarga ocorrendo às primeiras ionizações do argônio. Quando esse gás condutivo chega à região do campo e com o aumento da energia liberada pelo gerador de radiofrequência ocorre aceleração das partículas carregadas (íons e elétrons) gerando colisão entre as espécies existentes mantendo o plasma sustentado pelo efeito cascata que neste caso é chamado de *matching Box*.¹⁰⁵ A Figura 2 representa o plasma com destaque para a diferença de temperatura em suas diversas regiões.¹⁰⁶

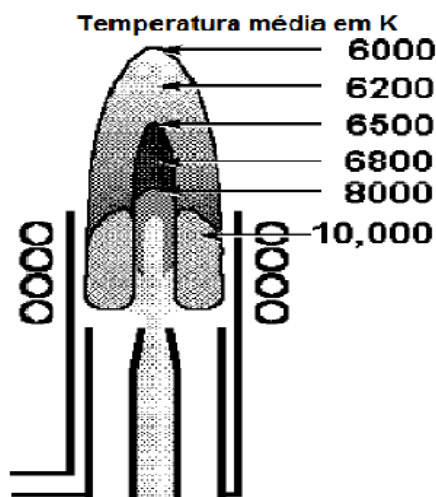


FIGURA 2 - Temperaturas em várias regiões do plasma
 Fonte: Boss e Fredeen (1997)¹⁰⁶

A amostra introduzida na “chama física” é dessovatada, volatilizada e por fim os átomos presentes podem ser excitados ou ionizados e os íons são excitados, portanto pode-se realizar a contabilização da radiação referente a uma linha atômica ou iônica. Durante o processo de excitação térmica também se encontram no plasma moléculas e íons radicais excitados, mas devido à alta temperatura do plasma (até 10000 K) há na maioria dos casos, densidade superior de íons excitados.¹⁰⁶ Na determinação de halogênios há uma distinção com relação a análise de metais, pois eles possuem alta energia de ionização gerando baixa densidade de átomos e íons excitados no plasma, consequentemente há alto limite de detecção sendo necessária a adesão de estratégias que melhorem essa resposta, tais como o uso das linhas mais sensíveis, estudos de eliminação de interferentes e a otimização dos parâmetros instrumentais.

Em ICP OES a energia contabilizada refere-se à emissão espectral devido à excitação de átomos e íons por uma fonte de grande energia, portanto nessa técnica não ocorre o problema de auto-absorção como em espectrometria de absorção atômica (AAS), permitindo que a faixa linear de trabalho seja extensa.

A maioria dos equipamentos de ICP OES fabricados na atualidade é *dual view*, ou seja, permite perceber a radiação emitida pelas partículas excitadas na amostra em uma visão axial que é no mesmo sentido do plasma ou na radial que é perpendicular ao eixo da chama física.¹⁰⁷

Na axial é observada uma área maior do plasma, adquirido uma quantidade de maior de radiação, melhorando assim a sensibilidade da análise, portanto é a

configuração mais utilizada na quantificação de halogênios. Há neste caso maior possibilidade de contabilização de interferentes e para melhorar essa amostragem existem diversos artifícios que eliminam a calda do plasma (onde há maior recombinação de espécies). No equipamento usado neste estudo é usado o *shear gas*, ou seja, corte dessa região com um fluxo transversal de gás nitrogênio ou ar comprimido.

Na radial é amostrada uma região menor do plasma, ocasionando maior limite de detecção, porém menor efeito de interferentes. A região amostrada do plasma varia de 15-25 mm acima da bobina, região com temperatura entre 6500-6000 K.^{105,107}

Todo o fóton amostrado segue para o sistema óptico que objetiva selecionar a radiação da linha espectral escolhido na montagem do método para que possa ser enviado ao detector. A maioria dos espectrômetros permite análise na faixa de 190-1200 nm, porém há alguns equipamentos que trabalham no vácuo ou com sistema purgadores que diminuem a interferência gerada pelos componentes presentes no ar facilitando leituras de linhas abaixo de 190 nm, possibilitando determinar os elementos F, Cl, I, C, Br, P, S com mais facilidade.^{6,104}

Os componentes mais utilizados nos sistemas ópticos de ICP OES são: fendas para filtrar a radiação, lentes e espelhos que objetivam focar essa energia eletromagnética, rede ou grade de difração para a separação em ordens de energia e o prisma responsável pela refração, ou seja, separação dos comprimentos de onda. Existem diversas configurações de espectrômetros e elas variam de acordo com o fabricante.

Os arranjos mais comuns são sistema óptico com rede Echelle e com círculo de Rowland. O primeiro refere-se a um equipamento sequencial, permitindo a leitura multielementar, porém cada linha espectral de uma vez, possuindo apenas um detector. Ele se diferencia por possuir a grade de difração do tipo Echelle e por permitir maior flexibilidade na escolha das linhas. No segundo caso trata-se de um sistema simultâneo, ou seja, é possível a análise de diversos elementos ao mesmo tempo por possuir diversas saídas da radiação e cada uma compreendendo um detector. Esta configuração recebe esse nome pela disposição dos componentes formarem um círculo.¹⁰⁵

Os detectores são responsáveis por transformação da energia luminosa em sinal elétrico e no caso desse tipo de equipamento são utilizados os detectores em estado sólido. Esses componentes possuem um elemento de detecção que é constitui de material semi-condutor que na maioria dos casos é silício e quando a radiação incide sobre esse material há a remoção de elétrons formando uma vacância. Há a geração de um campo elétrico pela aplicação de tensão e quando os elétrons livres chegam a essa região são movimentados no sentido contrário, gerando corrente elétrica que, portanto, é proporcional a radiação incidida. A utilização desse tipo de detector possui as seguintes vantagens: diminuição de interferências devido a linhas espectrais muito próximas, armazenamento de informações para que elas possam ser reprocessadas e possibilidade de análise em concentrações mais altas. Para a quantificação de halogênios deve-se observar se os detectores são sensíveis à radiação liberada por esses elementos, ou seja, geralmente na faixa do VUV.¹⁰⁶

Nos softwares são apresentados os espectros gerados na análise e a quantificação do analito é realizada pela área do pico ou a intensidade máxima do sinal gerado pela radiação. Estes programas também são utilizados para seleção de todas as condições operacionais a serem utilizadas, realizar testes de qualidade e para selecionar a área do espectro a ser contabilizada visando eliminação de interferentes.¹⁰⁸

1.2.2.2.1 Determinação de iodo por ICP OES

Devido à dificuldade em desenvolver métodos de determinações de iodo por essa técnica existem poucos trabalhos publicados com este assunto, porém por se tratar de um equipamento bastante versátil e popular é válida a utilização do ICP OES com este objetivo.

Os limites de detecção dos métodos de determinação de iodo por ICP OES são de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 8,31 mg L^{-1} , variando de acordo com a complexidade das amostras, as condições operacionais usadas e o método de determinação, uma vez que a geração de vapor de iodo em linha acarreta em considerável melhora nos limites detectáveis.^{17,106}

Niedobova *et al.* (2005)⁵⁰ desenvolveram um método bastante sensível para determinação de iodo em leite através da amostra preparada por calcinação alcalina, seguindo de digestão das cinzas e geração de vapor de iodo por oxidação do iodeto com peróxido de hidrogênio em meio de ácido sulfúrico. O sistema desenvolvido para acoplar ao ICP OES possuía uma entrada de gás, permitindo a separação da matriz do vapor gerado, podendo-se utilizar a linha mais sensível (178,218 nm) sem apresentar interferência espectral.

Novamente Niedobova *et al.* (2005)¹⁰⁹ tentaram determinar o teor de iodo em algas *Chlorella*, porém o método não apresentou LD (limite de detecção) adequado partindo para a detecção da amostra fortificada. As algas foram preparadas com extração alcalina e foi utilizado comprimento de onda 182,980 nm, pois alinha mais sensível 178,218 nm apresentou interferência do fósforo.

Oliveira *et al.* (2012)⁶ estudaram a possibilidade de quantificar o iodo no sal de cozinha, ou seja, matriz de difícil análise uma vez que possui grande quantidade de elementos de fácil ionização roubando energia do plasma. Foi realizado um estudo sobre efeito de matriz identificando tal problema, cabendo a utilização da curva calibração por compatibilização.

Krengel-rothensee *et al.* (1999)⁷⁵ adicionaram gás oxigênio junto ao gás de plasma para eliminar o acúmulo de carbono no tubo injetor de quartzo e diminuir a interferência dos compostos gerados, tais como C₂, CH e outros. Neste estudo foi desenvolvido um método de análise de não metais (S, Br, Cl, P e I) através do preparo da amostra diluída em querosene e quantificação dos elementos em linhas na faixa de (130-190 nm).

Souza *et al.* (2002)¹¹⁰ testaram o preparo de diversas amostras por uma bomba de oxigênio comercial para determinação de I, Cu, K, Mg, Na, P, S e Zn. As condições operacionais utilizadas no ICP OES foram baseadas em outros trabalhos. Para a determinação de iodo foi utilizada a linha 179,847 nm não havendo interferência espectral de P e S e sendo possível a análise dos 3 materiais de referência de leite.

No estudo realizado por Al-ammar *et al.* (2001)¹¹¹ avaliou-se o efeito de memória do tório e do iodo sobre o ICP-MS ao analisar uma amostra preparada em meio de ácido nítrico diluído. Segundo os autores a absorção de HI e I₂ ocorre nas tubulações poliméricas e na câmara de nebulização utilizada (*Ryton Scott double*

Pass) e como esta parte do equipamento é similar no ICP OES, acredita-se que este efeito também pode ser observado nesta técnica. Para eliminação da interferência foi utilizada um fluxo de gás amônia ou uso de solução de amoníaco nas amostras preparadas e padrões diminuindo o tempo de lavagem entre as análises para menos de 2 min. Nos testes foram utilizados materiais de referência de alimentos.

Segundo Yu *et al.* (2013)⁹¹ é possível determinar iodo no equipamento com o plasma gerado por descarga de barreira dielétrica (DBD OES). Neste estudo utilizou-se como gás de plasma o hélio e a linha de 905 nm, pois o detector não permitia análise abaixo de 190 nm. Foi realizada análise de medicamento sólido e de sal de cozinha sendo preparados por dissolução em meio aquoso seguindo do método de geração de vapor de iodo em linha pela reação com peróxido de hidrogênio. Existe a necessidade de redução previa do iodato contido nas amostras de sal sendo realizada com solução de ácido ascórbico.

Os métodos de determinação de iodo por ICP OES tem como vantagens a possibilidade de realização de determinações conjuntas de outros elementos tais como cloro e bromo, o uso de equipamentos populares e com grande aplicabilidade. Por outro lado, os equipamentos e os gases utilizados nesta técnica geram um custo elevado na utilização.

1.2.2.3 Espectrofotometria UV-VIS

A espectrofotometria UV-VIS é uma técnica analítica relativa utilizada na determinação de várias espécies orgânicas e inorgânicas e consiste na incidência de radiação eletromagnética com comprimento de onda na faixa do UV-VIS (160 nm a 780 nm) sobre a amostra líquida ou preparada em solução, fazendo com que as moléculas ou íons absorvam energia. A medida pode ser realizada pela quantidade de luz absorvida (absorbância) ou pela quantidade de energia que atravessou a amostra e não foi absorvida (transmitância).^{101,105}

A amostra é inserida no equipamento através de uma célula transparente (cubeta) que pode ter comprimentos diferentes. A luz emitida por uma fonte (lâmpada) atravessa um sistema óptico para que haja a seleção do comprimento de onda específico a ser incidido na amostra. Os espectrofotômetros são comercializados com óptica de diferentes complexidades, sendo que os mais

simples contêm apenas filtros, já os mais robustos contêm até monocromadores. O feixe de luz que atravessa a amostra chega ao detector geralmente do tipo fotomultiplicador havendo uma conversão de sinal que é resultado em valores de absorbância e transmitância.¹¹²

Para a determinação da concentração de um analito por esta técnica utiliza-se a equação 1 a lei de Lambert-Beer, como é demonstrado a baixo^{105,104,110}:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Em que A é a absorbância, T é a transmitância, P_0 é a intensidade da radiação antes da cubeta (total), P é a intensidade da radiação depois da cubeta (parcial), ϵ é a absorvidade molar, b é o comprimento do caminho óptico (cm) e c é a concentração.

A Figura 3 o esquema da detecção da energia absorvida por um espectrofotômetro de simples óptica.

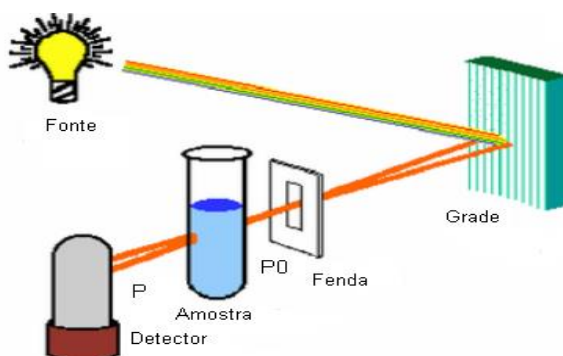


FIGURA 3 - Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples
Fonte: www.c2o.pro.br/automacao/x2083.html¹⁰⁸

O espectrofotômetro UV-VIS também pode ser usado para realizações de análises cinéticas, ou seja, análise em que a concentração de uma determinada molécula ou íon varia de acordo com o tempo. Alguns equipamentos fazem essa medida e o software gera o gráfico de concentração (eixo x) com relação ao tempo (eixo y), já em outros equipamentos mais simples é necessária à utilização de um cronômetro para marcar o tempo.

A curva de calibração de tais procedimentos geralmente relaciona a concentração do analito no eixo x e a taxa de alteração da absorbância (módulo da diferença da absorbância inicial e final com relação a um tempo) no eixo y, mas

também pode-se utilizar no eixo y a absorção em um tempo fixo ou o tempo necessário para que haja o consumo ou formação do composto que gera a absorção.^{14,60,113}

Os métodos espectrofotométricos baseados em reações requerem grande rigor na execução, uma vez que algumas condições tais como a temperatura e às vezes a presença da luz pode interferir na velocidade de formação dos produtos, interferindo no sinal gerado.

A maioria das determinações cinéticas se trata de reações em que o analito é um catalisador, tais como reações aceleradas em meio a enzimas. Outro tipo de análise cinético, porém menos utilizadas é a não catalítica, ou seja, que contabilizam a taxa de alteração da absorbância de uma espécie de acordo com a sua redução ou oxidação.^{21,108}

1.2.2.3.1 Determinação de iodo por espectrofotometria UV-VIS (Sandell-Kolthoff)

Esse método baseia-se na reação de oxirredução entre o cério (IV) e o arsênio (III) que é catalisada pelos íons iodeto, assim como apresentado abaixo (reações 10 e 11).^{114,115}



Portanto a reação de oxirredução (Ce^{4+}/As^{3+}) se processa com uma etapa a mais e tem um grande aumento da velocidade em relação à oxirredução csem a utilização do catalizador. A quantificação é realizada a 420 nm, pois os íons de cério IV são amarelos e ao diminuírem a concentração diminuem também a absorbância.

As determinações de iodeto por espectrometria de Sandell-Kolthoff têm sido realizadas principalmente em amostras simples, uma vez que diversos íons e compostos podem interferir, tais como: KBr, $MgSO_4$, NaCl, NO_2^{-} , SCN^{-} , BrO_3^{-} , sais de Fe, Cu e Mn, que estimulam a reação de Sandell-Kolthoff e sais de Ag e Hg, F^{-} , NaF, KH_2PO_4 , $ZnSO_4$, KCl que inibem tal reação.^{31,114}

Os limites de detecção dos métodos que utilizam a reação de Sandell-Kolthoff são bastante baixos $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ – $9,30 \mu\text{g L}^{-1}$, variando de acordo com a etapa de preparo de amostra, quanto ao uso de soluções de cério e arsênio em concentração e volumes diferentes e quanto ao comprimento de onda em que a leitura é realizada.^{14,116} Os métodos ainda variam na utilização de vários compostos contendo o Ce^{4+} , no tempo e temperatura de leitura, utilização de soluções para interromper a reação de oxirredução e a automatização dos procedimentos.¹¹⁷

Ohashi e colaboradores (2000)¹²⁰ testaram um novo método de digestão para amostras de urina com persulfato de potássio em um sistema vedado para evitar as perdas do analito. A análise foi realizada com solução de arsênio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, solução de cério $0,019 \text{ mol L}^{-1}$ e solução da amostra digerida permanecendo por 30 min a 25°C , tendo a absorbância medida a 405 nm e a curva de calibração registrada com o cálculo do logaritmo das absorbâncias pela concentração das soluções padrões de iodeto.

Mashesh *et al.* (1992)²¹ quantificaram o teor de iodo em alimentos preparados através da calcinação alcalina. A análise se processou com uma mistura de água, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, adição de uma alíquota da solução de cério (5 mmol L^{-1}) e solução de arsênio (30 mmol L^{-1}) sendo pré-incubadas a 37°C por 2 min, tendo as absorbâncias medidas continuamente durante 1 min a 370 nm. A curva de calibração foi construída pela taxa de decrescimento das absorbâncias em função do tempo (x), pela concentração do padrão (y).

Trokhimenko e Zaitsev (2004)¹¹⁸ analisaram amostras de leite e ovos através do método de Sandell-Kolthoff. As amostras foram preparadas através de calcinação alcalina e na análise utilizou-se solução de arsênio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, ácido sulfúrico 8 mol L^{-1} , solução de cério a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo misturados a 30°C . Após 5 min foi adicionada a solução do ácido difenilamina-4-sulfônico para parar a reação, tendo a absorbância medida a 750 nm em um espectrofotômetro.

Aumont e tressol (1987)²⁰ desenvolveram um método para determinação de iodeto no plasma sanguíneo animal, uma vez que é difícil a coleta da urina. Foi necessária a precipitação previa das proteínas em meio de etanol, seguido da separação do iodo inorgânico do ligado a composto orgânico através de uma coluna de cromatografia iônica, uma vez que a calcinação reduziria as outras formas de iodo a iodeto. A análise foi realizada com solução de arsênio (0,4 %) e solução de

cério (0,32 %), mantendo a mistura a 50 °C durante 28 min. Adicionou-se solução de brucina (0,5 %) para parar a reação e efetuou-se a medida em espectrofotômetro a 420 nm.

Este método tem baixo custo em comparação com outras técnicas instrumentais tais como cromatografia, ICP OES, ICP-MS, XRF. Ele possui como vantagens a agilidade na aquisição dos resultados, dificuldade de execução moderada e a utilização de equipamento popular e com grande aplicabilidade, em especial para análise de medicamentos. O método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff pode ser aplicado a faixas de trabalho em baixas concentrações e possui alguns íons e compostos que podem dificultar ou impossibilitar a determinação da concentração de iodo nas amostras, sendo vários deles citados na literatura.

1.3 Otimização por meio de planejamento fatorial

Otimizar significa obter a melhor eficiência em um dado processo ou sistema de forma a torná-lo o mais efetivo e funcional possível.¹²¹ Ao otimizar um sistema ou processo deseja-se encontrar determinados valores das variáveis que geram influência na resposta, afim de torná-la máxima ou mínima.

Antigamente as otimizações eram realizadas exclusivamente de forma univariada, avaliando a alteração das respostas em função dos valores (níveis) sem levar em conta a influência que as variáveis (fatores) poderiam ter ao serem utilizados concomitantemente. Nestes casos cada fator é avaliado com um conjunto de experimentos, portanto para chegar às respostas otimizadas com vários parâmetros é necessário uma grande quantidade de experimentos.

Hoje, quando se tem noção do intervalo de valores que podem influenciar um sistema, geralmente são utilizadas as otimizações multivariadas que avaliam os processos indústrias ou laboratoriais de forma mais eficiente além de diminuir a quantidade de experimentos a serem realizados.

Nos planejamentos fatoriais, tipo de otimização utilizada neste trabalho, os experimentos são realizados seguindo a disposição das matrizes de contrastes e são executados randomicamente, objetivando minimizar erros, principalmente provenientes de tendências dos analistas.¹²²

Em uma otimização devem ser estabelecidos inicialmente os fatores que apresentam influências significativas sobre a resposta que se deseja estudar e caso não sejam conhecidos é necessário selecionar as variáveis do sistema as quais haja suspeita sobre a influência e realizar experimentos de planejamento fatorial do tipo triagem, testando-se todas as combinações possíveis. A seleção dos níveis geralmente é baseada em conhecimentos técnicos, limitações instrumentais ou em literatura e estes podem ser qualitativos ou quantitativos.

Para utilização da matriz de contrastes na organização dos experimentos é necessário utilizar a equação 2 para codificação dos níveis.¹²³

$$Xi = \frac{Zi - Zm}{\frac{\Delta z}{2}} \quad (2)$$

Onde Xi é um valor atribuído a matriz que varia de acordo com o método, Zi é o nível aplicado, Zm é a média do valor do maior e do menor nível e Δz é a variação entre o mais e menor nível atribuído.

A quantidade de experimentos realizados no planejamento fatorial simples segue a expressão 2^k , em que k é a quantidade de variáveis e usa-se 2 devido a quantidade de níveis estudados.¹²¹

Na triagem avalia-se a normalidade dos coeficientes do modelo empírico gerado através da construção do gráfico de probabilidade acumulativa, podendo-se concluir que os pontos fora da reta representam os fatores significativos. Essa avaliação também pode ser realizada pela multiplicação dos erros pelo T de student (95 % de confiança), indicando ser significativo quando o valor zero não compreende o intervalo do coeficiente \pm o valor calculado anteriormente.¹²⁴

Após a aplicação da triagem, segue a realização do planejamento fatorial relativo à otimização propriamente dita, utilizando um método apropriado para tal.

A metodologia de superfície de resposta, é uma técnica de otimização desenvolvida pelo inglês George Edward Pelham Box na década de 50, na qual a relação entre os fatores selecionados e as respostas dos experimentos geram uma expressão matemática que da origem a gráficos 3D permitindo retirar valiosas informações sob o comportamento das variáveis na região estudada.¹²⁵ O

procedimento é constituída por duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Estas etapas podem ser repetidas até atingir uma região ótima, máxima ou mínima, da superfície investigada. A expressão matemática gerada no estudo pode ser de n graus, mas comumente é linear ou quadrática.

Dentre os diversos tipos de planejamento fatorial há destaque para o planejamento com composto central por permitir testar três ou mais níveis, fornecendo um número pequeno de experimentos se comparado a outros planejamentos, além de gerarem robustez dos resultados, que são resistentes aos impactos de condições não ideais, além da simplicidade dos cálculos visto que a metodologia gera polinômios.^{121,126}

O planejamento com composto central tem também os níveis codificados assim como na triagem, porém seguindo uma outra matriz na qual possui pontos referente a um planejamento fatorial simples de dois níveis (-1 e +1) e k fatores, pontos referentes a um planejamento axial variando de $-\alpha$ a $+\alpha$, com pontos nulos (centrais), os quais devem ser repetido no mínimo três vezes. Portanto a quantidade de experimentos são 2^k (fatorial completo) + $2k$ (axial) + 3 (no caso de triplicata dos pontos centrais) e são dispostos de forma fixas a serem seguidas, podendo variar apenas a localização dos pontos centrais.¹²¹

As repetições no ponto central têm a finalidade de fornecer uma medida do erro puro, a variância da resposta prevista e o valor de α que geralmente é estabelecido usando o conceito de rotabilidade.^{123,126}

Após estipular a matriz dos ensaios deve-se realizar os experimentos e aplicar sobre as respostas uma regressão linear múltipla gerando uma expressão matemática. A observação dos pontos de máximo e mínimo pode ser realizada através do cálculo ou através da observação das superfícies (gráficos) gerados. Vale a pena ressaltar que as respostas (pontos críticos) observadas nas duas formas de avaliação estão codificadas havendo a necessidade do uso da equação 2 para se encontrar os valores reais.

Como forma de obtenção de resultados seguros é realizada a validação do modelo gerado através da análise de variância ANOVA.¹²⁷ A Tabela 2 apresenta as expressões que devem ser calculadas.

TABELA 2 - Expressões para validação do modelo matemático

Fonte	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Valor do F
Regressão	$SQR = \sum_i^m \sum_j^{ni} (Y_{ia} - Y_m)^2$	p-1	$MQR = \frac{SQR}{p-1}$	$F = \frac{MQR}{MQ_r}$
Resíduo	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{ni} (Y_i - Y_{ia})^2$	r-p	$MQ_r = \frac{MQ_r}{n-p}$	-
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (Y_{ia} - y_{iam})^2$	m-p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$	$F = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (Y_i - Y_{iam})^2$	r-m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$	-
Total	$SQT = SQR + SQ_r$	r-1	-	-

Fonte: Barros-neto, Scarminio e Bruns (2003)¹²⁴

Em que i e j são níveis de experimentação; ni é número de repetições no nível i; m é o número de níveis distintos da variável independente; r é o número total de observações; p é número de parâmetros do modelo; Y_{ia} é a resposta esperada, ou seja, estimada pelo modelo; Y_i é a resposta obtida nos experimentos; Y_m é o valor médio de Y_i ; Y_{iam} é a média do Y_i em que a resposta de cada ponto central é a média das respostas nas replicatas e F é o valor calculado no teste estatístico de variância.

Na avaliação do modelo quanto à regressão e os resíduos considera-se adequado quando o F calculado é superior ao valor o F crítico (95 % de confiança), demonstrando relação linear entre as variáveis x e y. Na avaliação da falta de ajuste e do erro puro o F calculado deve ser inferior ao F tabelado (95 % de confiança), mostrando que o modelo é ajustado.¹²⁷

Outra avaliação realizada é através do calculo do coeficiente de correlação de Pearson (R^2) que exprime o grau de relação entre as variáveis do modelo gerado e quanto mais próximo de 1, mais adequado é o valor.

Mota (2011)¹²¹ e Peixoto, Oliveira e Cadore (2012)¹²⁸ utilizaram o ICP OES na determinação de diversos elementos em achocolatados e em vinhos respectivamente e realizaram a otimização das condições operacionais do equipamento através do planejamento fatorial com composto central, usando não mais a intensidade como respostas, mas sim a relação dos sinais encontrados na leitura de magnésio nas linhas 280,270 nm e 285,213 nm, ou seja, condição de avaliação da robustez.

Peixoto, Oliveira e Cadore (2012)¹²⁸ ainda realizaram a otimização usando como resposta a relação sinal fundo (SBR), porém não encontraram similaridade entre os pontos críticos avaliados para todos os fatores usando os dois tipos de reposta, necessitando de conhecimento técnico para seleção de uma das condições.

Oliveira *et al.* (2012)⁶ desenvolveram um método de determinação de iodo em amostras de sal por ICP OES e para isso realizaram dois planejamentos com composto central na avaliação das condições operacionais do equipamento com condição axial e radial. Foi constatado que a condição axial apresentou cinco vezes mais sensibilidade do que a outra condição.

As otimizações multivariadas já foram utilizadas no desenvolvimento de métodos de determinação de iodo nas etapas de preparo de amostras⁵¹ e na otimização das condições operacionais dos equipamentos.^{50,60,109}

1.4 Avaliação das características de desempenho dos métodos analíticos

A verificação da qualidade dos métodos é realizada por meio da avaliação dos parâmetros de desempenho, podendo assegurar a veracidade dos resultados das análises e dessa forma, utilizá-los na tomada de decisão como na avaliação da conformidade de um produto ou serviço com relação a uma especificação, na avaliação do cumprimento de uma norma ou lei, entre outros.¹²⁹

Esta etapa faz parte do processo de desenvolvimento de métodos e deve ser realizada após o estudo prévio e a otimização das condições experimentais, para que não apresentem resultados inadequados.

Órgãos governamentais e federais brasileiros que regulam determinadas atividades que requerem a execução de uma análise química desenvolveram guias de validação de métodos nos quais apresentam os procedimentos a serem seguidos e em alguns casos os limites de aceitação de cada procedimento, porém ao se aprofundarem no assunto pesquisadores e empresas podem realizar uma miscelânea de tais procedimentos a fim de gerarem procedimentos mais adequados e completos em relação ao método estudado.¹³⁰

O número de replicatas reais indicadas a serem realizadas na avaliação dos parâmetros de validação variam de acordo com o autor, mas comumente são utilizadas no mínimo três.^{24,127,134}

Quando os critérios de aceitação para os resultados dos testes de avaliação de desempenho analíticos não estão disponíveis nos guias de validação, é necessário utilizar a análise estatística ou a limites estabelecidos por empresas para avaliação da adequabilidade do método avaliado.

As características de desempenho mais estudadas são: linearidade, seletividade, faixa de trabalho, exatidão, precisão e robustez.²⁴

1.4.1 Faixa de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração no qual o analito presente na amostra pode ser dosado e que se refere ao intervalo no qual o modelo matemático gerado seja adequado, geralmente linear. A menor concentração da faixa de trabalho é o limite de quantificação e a maior concentração a ser quantificada depende da resposta analítica em função do sistema de medição (equipamento ou vidraria).²⁴

1.4.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente relativos à concentração do analito na amostra, no intervalo selecionado. Caso essa proporcionalidade gere uma reta, como na maioria das calibrações univariadas, a equação resultante é de 1º grau.¹³²

Para testar a linearidade devem-se preparar padrões de calibração que podem ser em meio aos solventes e reagentes utilizados no procedimento (padrões externos), ou em meio ao branco da amostra, ou em meio a reagente que possam simular a amostra (equiparação de matriz), ou ainda em meio da amostra (adição de analito).

Nas curvas de calibração com padrões externos, curvas em meio ao branco da amostra ou com equiparação de matriz é selecionado um intervalo de concentração dentro da faixa de trabalho dividindo-o em cinco pontos.^{133,134} Para métodos em que os padrões de calibração sejam adicionados sobre a amostra é indicado a adição de 50-200 % da concentração esperada do analito presente na amostra, formando um ponto apenas da amostra e quatro com adição do analito. Esses intervalos podem ser mais ou menos extensos de acordo com a sensibilidade do método e da técnica.¹³¹

A análise dos padrões de calibração resulta em um gráfico nos quais o eixo x representa as concentrações do analito e no eixo y a resposta instrumental, gerando-se um modelo matemático através da aplicação do método dos mínimos quadrados.²⁴

Iniciasse a avaliação da linearidade com o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (R^2) que deve apresentar valores, o mais próximo de 1, considerando-se adequado $\geq 0,91$, para provar alta correlação entre x e y.¹³²

Também se faz importante o estudo dos erros ou resíduos do modelo (y esperado–y obtido), registrando-os em um gráfico com concentração no eixo x e resíduos no eixo y, desejando-se que os pontos estejam em torno da reta horizontal no ponto 0,0, que sejam dispersos e que não demonstrem tendência.^{24,127} Para avaliar os resíduos deve-se ainda analisar a homocedasticidade, ou seja, a constância entre as variâncias destes erros de acordo com os níveis de concentração. Isto é feito através do teste não paramétrico de Leneve, Cochran ou Brown-Forsythe. Caso as variâncias não sejam homogêneas a regressão linear deve ser recalculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados.²⁴

O modelo matemático ainda pode ser avaliado através da análise de variância (ANOVA) concluindo a prevalência da regressão em relação aos erros, a relação entre x e y e a anulação ou não do coeficiente angular.²⁴

1.4.2.1 Sensibilidade

Esse valor expressa a capacidade do método de gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequena variação na concentração

do analito, portanto quanto mais sensível maior é a variação de sinal em alterações pequenas de concentração.^{24,130}

No caso da curva de calibração ser uma reta (equação de 1º grau), a sensibilidade é constante em toda a faixa de trabalho e é o coeficiente angular, já se a curva de calibração não é uma reta ou não for linear, a sensibilidade será a determinada pela derivada primeira da equação da curva de calibração, sendo variável em relação à concentração usada na faixa de trabalho.¹²⁹

1.4.3 Seletividade

A seletividade do método também conhecida como especificidade é a capacidade do método de determinar apenas o analito frente a possíveis interferentes e contaminantes que possam estar presente nas amostras.

Alguns testes comuns de serem realizados são com relação ao efeito de matriz. Em alguns casos, principalmente em cromatografia e espectrometria é aceito a análise do branco da amostra, branco de calibração (solvente ou demais reagentes usados no preparo do padrão), solução padrão, amostra preparada, avaliando-se o placebo e os reagentes apresentam ou não sinal significativo. Os experimentos mais comuns são com relação ao preparo dos padrões em meio ao branco da amostra e em meio apenas dos solventes, avaliando-se a similaridade das respostas em cada nível de concentração.^{130,135}

Caso não haja disponibilidade do branco de amostra pode-se executar a análise da curva de adição de analito e a curva com os padrões externos seguindo da aplicação do teste F entre os diversos níveis da curva de calibração, avaliando assim se o comportamento dos gráficos é semelhante.¹³²

As análises em que o efeito de matriz é identificado devem ser realizadas com o preparo da curva com equiparação de matriz, com adição de padrão interno ou da curva com adição de analito.^{131,132}

Quando há o efeito de matriz o método é considerado não seletivo, mas ao realizar os testes de exatidão e precisão adequadamente obtendo-se resultados dentro do limite de aceitação pode-se então considerar o método seguro.

1.4.4. Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o valor medido e o valor esperado e pode ser avaliada através de ensaios com material de referência certificados (MCR), testes de comparação entre métodos e ensaios de recuperação.¹²⁷

O uso de MCR deve ser indicado, pois neste caso o analito geralmente está presente na mesma forma química que na amostra, porém ainda não há materiais para todos os tipos de amostra sendo insuficiente o uso de materiais semelhantes. Para a verificação da adequação do resultado da análise do MCR ou amostra de referência pode ser usado o teste estatístico z-score, o cálculo de erro normalizado, o cálculo do erro relativo, ou apenas o cálculo da tendência (porcentagem do valor esperado).²⁴

O método desenvolvido pode ter os resultados das análises de uma amostra comparados com as respostas de outro método validado ou normalizado e para avaliar a equivalência entre os resultados aplica-se o teste F e teste T.¹²⁷

O ensaio mais realizado para avaliação da exatidão é o teste de recuperação/tendência que consiste na adição de padrão sobre a amostra ou pela matriz branca.¹³⁰ As fortificação geralmente são realizadas em três níveis de concentração que compreendem o intervalo das curvas de calibração e o cálculo a ser realizado está demonstrado na equação 3. O critério de aceitação depende da aplicação do método e da concentração trabalhada.^{24,135,136}

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} * 100 \quad (3)$$

Em que C_1 é a concentração total do analito na amostra fortificada, C_2 é a concentração do analito na amostra sem fortificação e C_3 é a concentração do analito adicionada.

1.4.5 Precisão

A precisão refere-se à dispersividade dos resultados do ensaio. Os testes podem ser realizados pela análise de material de referência certificado (MCR),

material de referência (MR) ou com padrões em meio ao branco da amostra em três níveis de concentração presentes no intervalo de calibração.¹³²

As principais formas de avaliação da precisão aplicam-se a estudos de repetitividade e reprodutibilidade.

1.4.5.1 Repetitividade

A repetitividade ou repetibilidade avalia o grau de dispersão dos resultados das análises em condições fixas, como: apenas um analista, apenas um equipamento, mesma temperatura e pH, etc.¹³²

Para avaliação da repetitividade deve-se realizar o cálculo demonstrado na equação 4 que refere-se ao coeficiente de variação (CV).¹²⁹

$$CV = \left(\frac{C_m}{S} \right) * 100 \quad (4)$$

Onde C_m é a concentração média e S o desvio padrão amostral das replicatas.

O intervalo de aceitação, assim como do teste de recuperação varia de acordo com a concentração do analito, o tipo de amostra e aplicabilidade do ensaio.^{129,132}

1.4.5.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é avaliada através do ensaio de proficiência no qual uma amostra preparada e certificada por um laboratório de grande confiabilidade é distribuída aos laboratórios participantes para que possam analisá-la pelos métodos de rotina ou método a ser validado e compará-la com o resultado dos laboratórios.

Esse ensaio comumente não é realizado devido ao custo e trabalho, mas é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos.²⁴

1.4.6 Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas variações experimentais nas quais está facilmente suscetível. Quanto mais robusto o método mais confiante é em relação à precisão.^{132,136}

A robustez pode ser avaliada através de planejamento univariado selecionando os parâmetros que se quer avaliar e alterando em no mínimo dois níveis, sendo possível a aplicação do teste F, T e ANOVA para avaliação da equivalência das respostas nestas alterações ou pode-se também aplicar o teste de youden que consistem em uma triagem (planejamento fatorial), ou seja, avaliação multivariada das condições alteradas.^{135,136}

Os parâmetros comumente testados são pH e temperatura da amostra ou dos reagentes, marca e pureza de reagentes, alteração de condições operacionais dos equipamentos, entre outras.¹³¹

Em ICP OES também é comum realizar a avaliação da robustez do plasma quando se realiza determinações de qualquer elemento. Este teste consiste na análise da amostra contendo magnésio ou fortificada com este elemento nas linhas 280 e 285 nm. As condições analíticas geram uma resposta robusta quando a relação entre resultado na linha 280 nm pelo resultado na linha 285 nm gera um valor de no mínimo 8 para configurações axiais e 10 para configurações radiais.^{137,138}

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Desenvolver métodos de determinação de iodo em amostras de premixes e xaropes por ICP-OES e espectrofotometria UV-VIS.

CAPÍTULO 3
DETERMINAÇÃO DE
IODO EM AMOSTRAS DE
PREMIXES

3. DETERMINAÇÃO DE IODO EM AMOSTRAS DE PREMIXES

Os animais domésticos, ou criados por humanos, são divididos em duas categorias: os de produção e os de estimação. Os animais de produção são alimentados com vegetais adequados a cada espécie e além disso, para o caso dos ruminantes usa-se o sal mineral. Porém em regiões ou épocas do ano carentes desses vegetais se faz uso de rações que é uma boa alternativa por ter um balanço nutricional ideal para o animal variando de acordo com a espécie, idade, clima e muitas vezes sexo e estado fisiológico.¹³⁹ Os animais domésticos em geral são alimentados exclusivamente de ração.

As rações são constituídas de ingredientes e nutrientes. Os ingredientes são os componentes necessários em grande quantidade e que objetivam fornecimento de carboidratos, proteínas e lipídeos, já os nutrientes são substâncias necessárias em menores quantidades, sendo adicionados principalmente na forma de premixes, ou seja, uma pré-mistura de minerais, podendo conter vitaminas, aminoácidos e fármacos tendo ainda veículo ou excipiente para facilitar a dispersão no meio dos ingredientes da ração. Os minerais mais usados na composição dos premixes são cálcio, ferro, iodo, flúor, magnésio, manganês, zinco entre outros.

Apesar de o desempenho animal ser dependente de fatores genéticos e ambientais, sabe-se que a eficiência alimentar é importante no desenvolvimento em termos de crescimento, produção de tecidos, procriação e geração de produtos. Na formulação de premixes e rações deve-se levar em consideração não apenas o teor de um único componente, mas seu conjunto, suas interações, e a ingestão máxima dos mesmos para cada tipo de animal, havendo a necessidade de metodologias analíticas que venham a garantir o teor de cada componente.¹⁴⁰

O MAPA é o órgão brasileiro responsável pela regulamentação e fiscalização do setor de produtos destinados à alimentação animal, portanto, o estabelecimento que fabrica, fraciona, importa, exporta e comercializa rações, premix, suplementos e outros produtos destinados a animais deve ser registrado, seguindo uma série de regras.^{141,142}

Dentre as normas e leis da área de alimentação animal destaca-se a Instrução Nº 13, de 30 de novembro de 2004 que relata a exigência da descrição dos métodos qualitativos e quantitativos aplicados no controle de qualidade, na

documentação para registro de aditivos (premixes), além do que pode ser exigido em caso de fiscalizações, relatórios referentes às análises realizadas em um determinado período.¹⁴²

O MAPA permite a adição de iodo em aditivos e produtos destinados a alimentação de animais de companhia na forma de iodato de cálcio, iodeto de potássio e iodato de potássio, já para animais de produção também é autorizado o uso de iodeto e iodato de sódio.^{143,144} É retratado que o uso de iodato na alimentação animal gera uma absorção mais lenta, além de poder causar maiores conteúdos de iodo no sangue, urina e fezes, devido a perdas de armazenamento mais elevadas, em comparação com o iodeto. As formas de iodato são quimicamente mais estáveis podendo apresentar menos perdas por volatilização sendo mais utilizadas.¹⁴⁵

O desenvolvimento de método de determinação de iodo em premixes é de grande importância devido a necessidade que as empresas têm de certificar seu produto. Esse assunto se mostra desafiador, devido a escassez de trabalhos com conteúdos relacionados a este, a dificuldade da solubilização do iodato de cálcio^{9,12,16,83} e a necessidade do desenvolvimento de um procedimento de preparo de amostra capaz de utilizar grandes quantidades de amostra devido a heterogeneidade da matriz.^{12,83}

3.1 Parte experimental

Esta parte do trabalho refere-se às alterações realizadas no método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff e a tentativa de determinação de iodo nas amostras de premixes por este método. Também é retratado o desenvolvimento de método de determinação de iodo nas amostras de premixes por ICP OES. Foi avaliada algumas características de desempenho do método por ICP OES.

3.1.1 Instrumentação

Para o preparo de amostras foram usados banho ultrassom Thornton[®] T14 com frequência de onda fixa, pHmetro MS Tecnocon equipamentos de laboratório

®mpa-210, balança analítica Sartorius® TE2145, chapa aquecedora, agitador magnético Quimis® Q-261.1.

A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema de deionização Quimis® Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis® Q342.

Os experimentos por espectrofotometria UV-VIS foram realizados no equipamento Pró-análise® 100 com o auxílio de um cronômetro digital Vollo®.

Os experimentos por ICP OES foram realizados em um equipamento Optima 7000, Perkin Elmer®, com dupla visão, equipado com *sheargas* (sistema de remoção da zona fria do plasma), detector em estado sólido (CCD), sistema pré-óptico com purga, possibilitando a análise em comprimentos de onda na faixa do VUV.

3.1.2 Materiais e reagentes

Para a solução padrão de iodo na forma de iodato utilizou-se iodato de cálcio P.A. Sigma-Aldrich®, já para a solução padrão de iodo na forma de iodeto foi usado iodeto de potássio P.A. Sigma-Aldrich®.

As soluções de descontaminação das vidrarias foram preparadas utilizando ácido nítrico P.A. Dinâmica Química Contemporânea® e ácido clorídrico P.A. Vetec®.

Para as determinações titulométricas utilizou-se tiosulfato de sódio P.A. Sigma-Aldrich®, dicromato de potássio P.A. Sigma-Aldrich®, ácido sulfúrico P.A. A.C.S. Sigma-Aldrich® e amido solúvel Vetec®.

Nas filtrações a vácuo utilizou-se membrana de fibra de vidro Marcherey Nagel® e acetato de celulose Filterpro®.

Nas extrações e padrões utilizou-se TMAH P.A. Vetec®, hidróxido de amônio P.A. Vetec®, ácido nítrico P.A. Vetec®, ácido clorídrico P.A. Fluka Analytical®, ácido sulfúrico P.A. A.C.S. Sigma Aldrich®, carbonato de sódio P.A. A.C.S. Synth®, carbonato de amônio P.A. Vetec®, citrato de sódio P.A. Sigma-Aldrich®, Ácido cítrico P.A. Millipore®.

Para as análises espectrofotométricas foram usados óxido de arsênio (III) P.A. A.C.S. Sigma-Aldrich®, sulfato de cério (IV) P.A. A.C.S. Sigma-Aldrich®, ácido sulfúrico P.A. A.C.S. Sigma Aldrich®, hidróxido de sódio P.A. F. Maia® e ácido ascórbico Synth®.

3.1.3 Soluções padrão

As soluções padrão com iodato ou iodeto foram preparadas na concentração de 100,00 mg L⁻¹ de iodo em meio aos solventes ou soluções utilizadas no preparo das amostras, seguido da diluição nos mesmos meios.

As soluções padrão não foram estocadas, ou seja, eram preparadas no momento da análise.

3.1.4 Preparo do material e vidrarias

Todas as vidrarias e tubos de falcon[®] utilizadas nas análises foram lavados com detergente e seguido da permanência em banho de ácido nítrico (Dinâmica Química Contemporânea[®]) e clorídrico (Vetec[®]) 2,5 % de cada componente, por 24 h e enxaguado com água purificada.

Todas as vidrarias e materiais foram secos dentro de um recipiente fechado para evitar contaminação.

Os tubos falcon[®] utilizados foram envolvidos em papel alumínio para preservar as soluções e amostras do contato com a luz.

3.1.5 Amostras

Foi realizado estudo de desenvolvimento de método de determinação de iodo nos premixes devido à demanda do mercado, segundo uma empresa local e devido às exigências do MAPA.

Os premixes analisados neste estudo são exclusivamente minerais.

Os premixes comerciais utilizados no estudo foram os 1, 3 e 4, sendo que os dois últimos foram manipulados por uma empresa especializada.

O premix 1 possui iodo proveniente de iodato de cálcio, já o premix 2 possui iodo na forma de iodeto de potássio. Foi simulado o premix 1 e 2 no laboratório (LQA) para que este pudesse ser usado nas análises subsequentes com menor custo e garantia da quantidade do analito.

Também foram simulados premixes com a mesma composição do premix 1, 2, 3 e 4, porém isentos de iodeto de potássio e iodato de cálcio. Portanto tais premixes foram utilizados como branco das amostras.

As matérias-primas utilizadas na produção dos premixes simulados eram adequadas á alimentação animal e foram adquiridas em uma indústria do setor, com exceção dos compostos contendo o analito que foram reagentes químicos com alta pureza.

A tabela 3, apresenta a composição dos premixes 1 e 2, já a tabela 4 demonstra a composição dos premixes 3 e 4.

TABELA 3 - Composição dos premixes 1 e 2

Matéria-prima	Teor em mg kg⁻¹
Enxofre	180000,0
Magnésio	200000,0
Cobalto	750,0
Selênio	187,5
Ferro	11500,0
Manganês	9250,0
Zinco	38500,0
Iodo	1000,0
Cálcio (premix 1)	9700,0
Potássio (premix 2)	6350,0

TABELA 4 - Composição dos premixes 3 e 4

Matéria-prima	Teor em mg kg⁻¹
Enxofre	180000,0
Magnésio	200000,0
Cobalto	750,0
Selênio	187,5
Ferro	11500,0
Manganês	8500,0
Zinco	42500,0
Iodo	1250,0
Cálcio (premix 1)	10900,0
Potássio (premix 2)	8350,0

As informações contidas nas tabelas 3 e 4 foram fornecidas pelas empresas produtoras e a composição não inclui informações dos veículos.

Antes de executar todas as extrações, os premixes foram macerados com grau e pistilo e misturados em uma saco plástico, a fim de obter um pó bastante fino e homogêneo.

Todas as amostras foram preparadas e analisadas em sequência, ou seja, os extratos não foram armazenados.

3.1.6 Determinação de iodo em amostras de premixes por titulação iodométrica

Esse método foi utilizado visto as características de agilidade na realização dos ensaios e ao baixo custo de análise.

O composto iodato de cálcio não é muito solúvel em água (0,42 g em 100 mL de água)¹⁴⁶ e ainda há na amostra outros compostos contendo cálcio (como veículo calcário), dificultando ainda mais a solubilização do analito. Portanto, foram realizados vários procedimentos de extração em duplicata, para seleção do mais eficiente, podendo então ser usado nas análises pelas técnicas de espectrofotometria UV-VIS e ICP OES.

Para a avaliação da eficiência de extração foram calculadas as recuperações, ou seja, porcentagem do resultado da análise em relação à concentração esperada.

Para análise utilizou-se soluções de tiosulfato de sódio 0,79 ou 1,58 g L⁻¹, previamente padronizadas com solução de dicromato de potássio 2,94 ou 5,88 g L⁻¹ e ácido sulfúrico para ajuste do pH.¹³ As determinações foram realizadas manualmente, com solução de amido 1 % (m v⁻¹) como indicador.

3.1.6.1 Testes de preparo da amostra do premix 1 (comercial) usando titulação iodométrica na quantificação

Segue na Tabela 5 as condições utilizadas nos procedimentos de extrações.

TABELA 5 - Testes de solubilização da amostra de premix 1 (comercial)

Nº	Massa da amostra (g)	Solvente/ solução	Tempo no banho ultrassom (min)	Condição	Volume Final (mL)
1	1,0000	15,0 mL de TMAH 25 %	30	-	50,00
2	1,0000	20,0 mL de TMAH 25 %	30	-	50,00
3	1,0000	25,0 mL de TMAH 25 %	30	-	50,00
4	1,0000	30,0 mL de TMAH 25 %	30	-	50,00
5	1,0000	15,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30	-	50,00
6	1,0000	20,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30	-	50,00
7	1,0000	25,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30	-	50,00
8	1,0000	30,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30	-	50,00
9	2,5000	45,0 mL de água	30	-	50,00
10	2,5000	95,0 mL de água	30	-	100,00
11	2,5000	45,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	30	-	50,00
12	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	30	-	100,00
13	2,5000	45,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	30	-	50,00
14	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	30	-	100,00

15	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	-	1 h a 45 °C em chapa aquecedora	100,00
16	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	-	1 h a 45 °C em chapa aquecedora	100,00
17	2,5000	95,0 mL de água	60	-	100,00
18	2,5000	45,0 mL de carbonato de sódio 1,06 g L ⁻¹	-	Agitação por 30 min com agitador magnético	50,00
19	2,5000	95,0 mL de carbonato de sódio 1,06 g L ⁻¹	-	Agitação por 30 min com agitador magnético	100,00
20	2,5000	45,0 mL de carbonato de amônio 0,96 g L ⁻¹	-	Agitação por 30 min com agitador magnético	50,00
21	2,5000	95,0 mL de carbonato de amônio 0,96 g L ⁻¹	-	Agitação por 30 min com agitador magnético	100,00
22	2,5000	95,0 mL de citrato de sódio 2,58 g L ⁻¹	60	-	100,00

Entre os procedimentos 14 e 15 (Tabela 5), realizou-se as diferentes extrações, utilizando 0,15 g do padrão de iodato de cálcio e os seguintes solventes ou soluções: 50,0 mL de TMAH 25 %, 50,0 mL de TMAH 0,1 %, 50 mL de hidróxido de amônio 27 %, 50,0 mL de hidróxido de amônio 0,1 %, 50,0 mL de água, 50,0 mL de ácido nítrico 5,0 %, 50,0 mL de ácido nítrico 10,0 %, 50,0 mL de ácido sulfúrico 25,0 %, 50,0 mL de ácido clorídrico 5,0 %, 50,0 mL de ácido clorídrico 10,0 %. As misturas foram mantidas em banho ultrassom até a solubilização.

Após as extrações e antes das diluições foram realizadas filtrações a vácuo com membrana de fibra de vidro.

Nos procedimentos contidos na Tabela 5, teve-se o volume final das soluções da amostra completado com as próprias soluções usadas em cada extração.

3.1.7 Determinação de iodo em amostras de premixes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Nesta parte do trabalho o objetivo da utilização do método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff foi verificar a aplicabilidade na quantificação de iodo em amostras de premixes, sendo assim, uma segunda opção em relação ao método desenvolvido por ICP OES.

Esse método foi selecionado devido à disponibilidade do equipamento e por ter gerado bons resultados na determinação de iodo em diversos tipos de amostras como água¹⁴, urina¹⁹, sal¹⁹, soro sanguíneo²⁰, alimentos²¹, entre outros³¹.

Foi realizada algumas modificações em relação a procedimentos já existentes^{14,90}, a fim de permitir a aplicação visto a estrutura disponível e também a fim de gerar maior agilidade nas análises.

Para as análises por este método foi necessário o preparo da solução de cério (IV) que consistiu em 0,42 g de sulfato de cério (IV) solubilizado em 200,0 mL de água e 6,3 mL de ácido sulfúrico, prosseguindo com a aferição do volume para 250,00 mL utilizando água.¹⁴

Para o preparo da solução de arsênio (III) foi usado 1,00 g do óxido de arsênio (III) e 1,50 g do hidróxido de sódio em 200,0 mL de água, seguido da adição de 6,0 mL de ácido sulfúrico e água até completar 250,00 mL.¹⁴

O método se processou com o uso de 500 µL do extrato da amostra, extrato do branco ou solução padrão com 1,00 mL da solução de arsênio e após 1 min houve a adição de 1,00 mL da solução de cério. Após 1 min da última adição fez-se a medida em espectrofotômetro a 420 nm. O tempo foi marcado pelo cronômetro.¹⁴

As curvas de calibração externa foram preparadas através da análise das soluções padrão de iodo na forma de iodeto de potássio, sendo registradas no eixo x: (0,10; 0,25; 0,50; 0,75) mg L⁻¹ de iodo e no eixo y o logaritmo neperiano (ln) das absorbâncias no tempo de 1 min.

Preparou-se e analisou-se soluções padrão de 0,10 e 1,00 mg L⁻¹ de iodo separadamente com iodato de cálcio e iodeto de potássio, objetivando verificar a possibilidade da determinação de iodato. As soluções contendo iodeto foram preparadas em meio aquoso, já as soluções contendo iodato foram preparadas em meio a solução aquosa de ácido ascórbico 20,00 mg L⁻¹ e 28,00 mg L⁻¹, aguardando-

se 1 h e também de 2 h antes da análise. Portanto foi comparado o resultado da análise (absorbância) das soluções padrão com iodeto, e as soluções padrão com iodato após 1 e 2 h de permanência em meio a solução de ácido ascórbico, objetivando avaliar a eficiência de redução.

Após os testes de redução foram preparadas as amostras de premixes, sendo verificada a possibilidade de determinar o iodo pela espectrofotometria de Sandell-Kolthoff. Esta avaliação foi de acordo com a proximidade com o resultado esperado.

3.1.7.1 Preparo das amostras de premixes para análise por espectrofotometria UV-VIS com reação Sandell-Kolthoff

Uma massa de aproximadamente 2,0000 g da amostra do premix 1 simulado (com iodato de cálcio) foi extraída com 450,0 mL solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, durante 1 h em banho ultrassom, seguido de filtração a vácuo e aferição do volume do extrato para 500,00 mL com a solução de citrato de sódio. Em sequência o extrato foi diluído com solução de ácido ascórbico 28,00 mg L⁻¹ até uma concentração de 0,50 mg L⁻¹ de iodo e aguardou-se 1 h para que a redução se completasse, efetuando-se então a análise.

Para a análise do premix 2 (com iodeto de potássio) realizou-se extração com 2,0000 g da amostra em meio a 450,0 mL da solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹. A mistura permaneceu 35 min em banho ultrassom, seguido de filtração a vácuo, aferição do volume final para 500,00 mL, diluição com solução de citrato de sódio e, por fim, execução da leitura esperando-se obter o resultado de 0,50 mg L⁻¹.

3.1.8 Determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES

Esta seção do trabalho refere-se ao desenvolvimento de método de determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES e foi utilizada essa técnica, pois ela permite a quantificação de alguns não metais com boa qualidade analítica¹¹⁰ e devido à disponibilidade do equipamento tanto na universidade quanto

na empresa local que possui a demanda por este método. Foi avaliada a qualidade através da análise de alguns parâmetros de validação.

Todas as medidas realizadas por ICP OES obtiveram como resposta a intensidade em modo área.

Nas análises por ICP OES foram construídas curvas de calibração preparadas separadamente com solução padrão de iodeto de potássio e com solução padrão de iodato de cálcio, na faixa de concentração 2,00 - 10,00 mg L⁻¹ de iodo em meio as próprias soluções usadas nas extrações.

A Tabela 6 apresenta as condições utilizadas no ICP OES.

TABELA 6 - Condições operacionais do ICP OES para análise das amostras de premixes

Parâmetros	Condições
Visão	Axial
Nebulizador	Gemcone alto teor de sólidos dissolvidos
Câmara de nebulização	Ciclônica para aquosos
Purga do sistema pré-óptico	Alta
Fluxo do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0*
Fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,50*
Potência (W)	Otimizado
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	Otimizado
Taxa de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)	Otimizado
	178,215
	189,215
Comprimento de onda (nm)	206,163
	206,188

*de OLIVEIRA, A. A.(2009)⁶

Inicialmente realizou-se análise de uma amostra de premix, branco de premix, soluções padrão referentes a curva de calibração e branco de calibração nas quatro linhas espectrais disponíveis no ICP OES para a determinação de iodo. A avaliação dos comprimentos de onda foi baseada na existência de interferentes espectrais e na intensidade do sinal gerado. Para essa análise preparou-se o premix 1 comercial através da extração com aproximadamente 2,0000 g da amostra em meio a 450,0 mL da solução de citrato de sódio a 2,58 g L⁻¹, durante 1 h em banho ultrassom. Em

seguida filtrou-se o extrato a vácuo e aferiu-se o volume até 500,00 mL com a própria solução usada na extração, efetuando em sequência a análise.

Para seleção de um procedimento de extração de iodo nos premixes que fosse eficiente, realizaram-se os procedimentos de preparo de amostra descritos no item 3.1.8.2 e 3.1.8.3 em duplicata, sendo avaliados através do cálculo da recuperação, ou seja, porcentagem do resultado em relação a concentração adicionada na matriz branca.

3.1.8.1 Otimização das condições operacionais do ICP OES para determinação de iodo

Realizou-se a otimização das condições operacionais do ICP OES pela metodologia de superfície de resposta, método do composto central, sendo estudada a potência, fluxo do gás de nebulização e taxa de aspiração da amostra.

Foi realizada otimização referente à solução padrão de iodato de cálcio e também com relação à solução padrão de iodeto de potássio, ambas em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, chegando a uma concentração de $3,00 \text{ mg L}^{-1}$ de iodo.

A validação dos modelos gerados foi realizada pelo teste estatístico ANOVA e os cálculos foram realizados através do *software* Matlab[®] versão 8.0.¹²⁴

3.1.8.2 Testes de preparo das amostras do premix 1 com quantificação por ICP OES

O iodato de potássio é um composto com iodo que possui alta massa molecular, é estável termicamente a $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$, não é higroscópico, e é relativamente solúvel em água, portanto em meio aquoso pode ser usado como padrão primário em análise titulométrica.¹⁴⁷ Tais características também se aplicam ao iodato de cálcio (composto presente na amostra), logo tentou-se preparar a amostra em solução aquosa diluídas de citrato de sódio e ácido cítrico não esperando encontrar problemas de estabilidade.

Foram realizadas análises de diferentes extratos para seleção do melhor procedimento de preparo de amostra e para isso usou-se o premix 1 simulado, ou seja, com iodato de cálcio. Nas primeiras extrações utilizou-se 2,0000 g da amostra e uma das seguintes soluções: 450,0 mL da solução citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, 450,0 mL da solução ácido cítrico 1,92 g L⁻¹, ambas misturas permaneceram 1 h em banho ultrassom antes da filtração a vácuo. Os extratos foram avolumados para 500,00 mL com as próprias soluções usadas em cada procedimento de preparação da amostra.

Realizou-se igual procedimento na amostra de premix 1 comercial em meio à solução de ácido cítrico 1,92 g L⁻¹, objetivando avaliar a eficiência da simulação da amostra.

Outro procedimento realizado para o premix 1 referiu-se ao uso de 20,0000 g da amostra em 900,0 mL da solução citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, seguido da permanência de 1 h em banho ultrassom, filtração e aferição do volume final para 1000,00 mL com a mesma solução usada na extração. Também se realizou procedimento de extrações consecutivas com 20,0000 g da amostra, 3 alíquotas de 250,0 mL e 1 alíquota de 200,0 mL da solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹. Cada mistura solução/amostra foi mantida em banho ultrassom por 40 min, seguido da filtração a vácuo e da aferição do volume para 1000,00 mL com a mesma solução usada no procedimento.

Nos extratos em que a concentração esperada do analito era superior a 4,00 mg L⁻¹, diluiu-os a fim de atingir tal concentração. Para essa operação utilizou-se as soluções usadas nas extrações.

3.1.8.3 Testes de preparo das amostras do premix 2 com quantificação por ICP OES

Os testes descritos abaixo foram efetuados com a amostra de premix 2, ou seja, amostra simulada.

Foram realizadas análises dos diferentes extratos preparados. Inicialmente utilizou-se alíquota de 10,0000 g com um dos seguintes solventes ou soluções: 450,0 mL de água, 450,0 mL de solução de TMAH 0,01 %, 450,0 mL de solução de hidróxido de amônio 0,01 %, 450,0 mL de solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, todos permanecendo 35 min em banho ultrassom, seguindo da filtração a vácuo. Os

extratos tiveram o volume final completado até 500,00 mL com os próprios solventes ou soluções usadas em cada procedimento.

Também se realizou extrações utilizando 20,0000 g da amostra em meio as seguintes soluções: 450,0 mL de solução de TMAH 0,01%, 450,0 mL de solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹. As misturas da amostra/solução permaneceram 35 min no banho ultrassom. Os extratos foram filtrados a vácuo e avolumados a 500,00 mL com as respectivas soluções usadas nas extrações.

Nos extratos em que se tinha mais que 4,00 mg L⁻¹ de iodo, diluiu-os a fim de atingir tal concentração. Para essas operações utilizaram-se as próprias soluções usadas nos procedimentos de preparo de amostra.

3.1.8.4 Avaliação da qualidade dos métodos de determinação de iodo em amostras de premixes usando ICP OES

Os testes descritos a seguir utilizaram para o preparo das amostras de premixes com iodato de cálcio o procedimento com: 20,0000 g da amostra, em meio a 900,0 mL da solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, sendo mantida 1 h em banho ultrassom. Após tais operações, o extrato foi filtrado à vácuo, seguindo da aferição do volume final para 1000,00 mL com a própria solução utilizada na extração.

Para o preparo das amostras de premix com iodeto de potássio utilizou-se 20,0000 g da amostra em meio a 450,0 mL da solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹, sendo mantidos 35 min em banho ultrassom. Após tais operações, o extrato foi filtrado à vácuo, seguindo da aferição do volume final para 500,00 mL com a própria solução utilizada na extração.

Nas análises referentes aos premixes com iodato utilizaram-se soluções padrão com iodato de cálcio, já nas análises relacionadas aos premixes com iodeto foram usadas soluções padrão com iodeto de potássio.

Para os testes de qualidade utilizou-se amostras simuladas do premix 1 (contendo iodato) e 2 (contendo iodeto).

3.1.8.4.1 Seletividade

A fim de verificar a seletividade do método foram analisados os brancos de calibração, brancos das amostras e para avaliação da equivalência entre as intensidades geradas foi feito o teste F e teste T. Para esse teste realizou seis replicatas de cada branco.

Outro teste realizado relativo à seletividade foi com relação à avaliação da curva com adição de analito e calibração externa. Para isso foi preparada e analisada soluções padrão em triplicata, referentes às curvas de calibração externa e com adição de analito, seguido do teste F aplicado em cada nível de concentração. Ambas as curvas de calibração foram realizadas nas concentrações de: 0,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,00 mg L⁻¹ de iodo. As soluções padrão das curvas de calibração com adição também tiveram adição de alíquota dos extratos.^{131,135}

3.1.8.4.2 Linearidade

As curvas de calibração externa (em triplicata) também foram usadas nos demais ensaios, portanto foi realizado sua avaliação por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (R^2), teste ANOVA da regressão, análise de resíduos por meio de gráficos e avaliação da sensibilidade (coeficiente angular da reta).²⁴ Para verificar a coerência da utilização do método de mínimos quadrados foi aplicado o teste estatístico de Cochran.¹⁴⁸

3.1.8.4.3 Efeito de memória

Devido ao potencial absorção/adsorção do iodo em diversos materiais é importante avaliar o efeito de memória nas análises por ICP OES e para isso foram realizadas leituras intercaladas da solução de calibração de 4,00 mg L⁻¹ de iodo e do branco de calibração, verificando se houve grande alteração da intensidade, principalmente do branco.⁶ As soluções padrão usadas neste teste foram preparadas com iodeto de potássio e o teste foi realizados com cinco medidas de cada solução.

3.1.8.4.4 Robustez do plasma

Outro ensaio realizado foi com relação à robustez do plasma e para isso foram preparadas soluções do extrato do premix 1, sendo realizada a leitura do magnésio na linha 280 (I) e 285 nm (II), seguindo do cálculo da relação entre a intensidade da linha (I) pela linha (II).^{138,149} As soluções foram analisadas cinco vezes.

3.1.8.4.5 Exatidão e precisão

Foram avaliadas a exatidão e a precisão (repetitividade) do método através da análise dos premixes brancos fortificados (premixes simulados 1 e 2) em triplicata. Na exatidão calculou-se a recuperação e na precisão avaliou-se o CV.^{129,132} Esses ensaios foram realizados em triplicatas reais.

3.1.8.4.6 Análise das amostras

Também foram analisadas as amostras de premixes comerciais 3 e 4 em triplicata como forma de avaliar a aplicabilidade dos métodos propostos.

3.2 Resultados e discussões

3.2.1 Testes de preparo do premix 1 (comercial) por análise titulométrica

As amostras foram preparadas através de procedimento de extração, visto que se trata de uma metodologia de menor custo e de manuseio mais simples do que as demais citadas neste trabalho. Além disso, na teoria, tal procedimento seria adequado, pois os analitos estão presentes na forma de sais livres, ou seja, não estão ligados a outros compostos.

Antes das análises, todos os extratos do premix iodato foram filtrados a vácuo com o auxílio da membrana de fibra de vidro. Para a seleção da membrana a ser usada, analisou-se 100,00 mL solução padrão de iodato de cálcio aquosa contendo a concentração $1,00 \text{ g L}^{-1}$ e também analisou-a após a filtração em uma membrana de acetato de celulose. Realizou-se procedimento similar com uma membrana de fibra de vidro. As determinações foram feitas por titulação. Com este teste observou-se que ambas as membrana não retiveram o iodato.

Também realizou-se testes filtrando 50,00 mL de TMAH 25 % e em outra membrana filtrando 50,00 mL de ácido nítrico 50,0 % ($v v^{-1}$). Esses ensaios também foram realizados com ambas as membranas. Observou-se que o filtro de fibra de vidro foi resistente em ambos os meios. Por outro lado, a membrana de acetato de celulose não foi resistente em nenhum dos meios.

Os primeiros extratos foram preparados através dos procedimentos descritos na tabela 7, sendo que o mais eficiente esta apresentado em negrito.

TABELA 7 - Procedimentos de extração 1 - 7 seguido da quantificação do iodo por titulação

1	1,0000	15,0 mL de TMAH 25 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
2	1,0000	20,0 mL de TMAH 25 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
3	1,0000	25,0 mL de TMAH 25 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
4	1,0000	30,0 mL de TMAH 25 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
5	1,0000	15,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
6	1,0000	20,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
7	1,0000	25,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
8	1,0000	30,0 mL de hidróxido de amônio 27 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL

Não são conhecidos os mecanismos que provam a eficiência do uso das soluções alcalinas no preparo das amostras com iodo, mas sabe-se que espécies voláteis desse analito são estabilizadas nesse meio. Portanto, iniciaram-se os testes com os reagentes mais utilizados em amostras contendo iodeto.

Nos resultados das análises dos extratos referentes aos procedimentos apresentados na Tabela 7 percebeu-se que a mudança dos extratores não gerou diferença significativa no rendimento. O aumento do volume das soluções melhorou a extração, porém ainda mostrou-se ineficiente. O rendimento alcançado foi $5,4 \pm 3,4$ % com a utilização de 30,0 mL de TMAH 25 %. Acredita-se que possam ter ocorrido perdas do iodato solubilizado, pois foi necessário adição de grande quantidade de solução ácida para o ajuste do pH que era aproximadamente 14 e deveria ser entre 1,5-2,0 para execução da análise.¹³

Os procedimentos seguintes estão apresentados na Tabela 8, sendo que o mais eficiente está em negrito.

TABELA 8 - Procedimentos de extração 9 - 14 seguido da quantificação do iodo por titulação

9	2,5000	45,0 mL de água	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
10	2,5000	95,0 mL de água	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 100,00 mL
11	2,5000	45,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
12	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 100,00 mL
13	2,5000	45,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 50,00 mL
14	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	30 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 100,00 mL

Nos procedimentos de 9 a 14, utilizou-se os meios ácidos, por serem reagentes bastante utilizados em análise elementar em geral. Como o iodato é relativamente solúvel em meio aquoso, foram realizadas testes de solubilização também neste solvente. Portanto, nesses procedimentos, observou-se que as

alterações realizadas geraram melhoria na eficiência do preparo da amostra, visto que o rendimento encontrado foi de $56,9 \pm 9,7$ % ao utilizar 95,0 mL da solução de ácido nítrico 10,0 %. Vale ressaltar que a alteração do volume de 50,0 mL para 95,0 mL não gerou mudança significativa no resultado. Acredita-se que as perdas advêm do uso do meio ácido, visto que parte do iodato pode ter convertido a iodo e se perdido durante as operações realizadas. Outra possibilidade da baixa porcentagem de extração pode ser devido ao tempo de permanência da mistura no ultrassom ser insuficiente.

Paralelo a esses testes foram realizadas extrações do padrão de iodato de cálcio em meio a diversos extratores. Como as misturas permaneceram em banho ultrassom até a solubilização do sal, confirmou-se que o tempo de permanência em banho ultrassom de 30 min era insuficiente.

A solubilização do padrão nos meios alcalinos mostrou ser menos eficientes que nos meios ácidos e neutros, pois foi necessário um tempo grande no ultrassom, ou seja, acima de 1h e 30 min.

Com relação ao uso de soluções ácidas (ácido nítrico 5,0 %, 10,0 %, ácido sulfúrico 25,0 %, ácido clorídrico 5,0 % e 10,0 %) e água, percebeu-se que a solução de ácido sulfúrico, ácido nítrico e água apresentaram similar eficiência, sendo necessário cerca de 1 h de permanência no banho ultrassom para solubilizar o soluto. As soluções de ácido clorídrico mostraram ser menos eficientes entre os meios ácidos testados e as diferentes concentrações das soluções ácidas não mostraram melhorias no procedimento.

Ao saber que o iodato de cálcio tem incompatibilidade a meios ácidos fortes¹⁴⁶ e que o preparo de amostras contendo iodo, em meio ácido com aquecimento a altas temperaturas (calcinações e digestões) não tem mostrado ser satisfatório⁶, realizou-se extrações descritas na Tabela 9.

TABELA 9 - Procedimentos de extração 15 e 16 seguido da quantificação do iodo por titulação

15	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 5,0 %	Aquecimento a 45 °C por 1h	Aferição do volume final para 100,00 mL
16	2,5000	95,0 mL de ácido nítrico 10,0 %	Aquecimento a 45 °C por 1h	Aferição do volume final para 100,00 mL

Os resultados médios de $50,0 \pm 6,8$ % de extração mostraram que não houve melhora com relação às extrações sem aquecimento e 30 min em banho ultrassom. Os meios testados (solução de ácido nítrico 5,0 e 10,0 %) apresentaram uma resposta similar, portanto decidiu-se realizar os próximos procedimentos com outro meio e maior tempo de permanência da mistura (amostra/meio) em banho ultrassom, estando apresentado na Tabela 10.

TABELA 10 - Procedimento de extração 17 seguido da quantificação do iodo por titulação

17	2,5000	95,0 mL de água	60 min em banho ultrassom	Aferição do volume final para 100,00 mL
-----------	--------	-----------------	---------------------------	---

Na análise dos extratos obtidos com o procedimento 17, atingiu-se uma resposta de $67,8 \pm 11,1$ %, provando que o aumento da permanência da mistura no banho ultrassom melhorou a resposta. A porcentagem de extração não mostrou ser eficiente, portanto testou-se outro meio como demonstrado nos procedimentos descritos pela Tabela 11, sendo que o procedimento em negrito gerou melhor resposta.

TABELA 11 - Procedimentos de extração 18 - 21 seguido da quantificação do iodo por titulação

18	2,5000	45,0 mL de carbonato de sódio $1,06 \text{ g L}^{-1}$	Mistura com agitador magnético	Aferição do volume final para 50,00 mL
19	2,5000	95,0 mL de carbonato de sódio $1,06 \text{ g L}^{-1}$	Mistura com agitador magnético	Aferição do volume final para 100,00 mL
20	2,5000	45,0 mL de carbonato de amônio $0,96 \text{ g L}^{-1}$	Mistura com agitador magnético	Aferição do volume final para 50,00 mL
21	2,5000	95,0 mL de carbonato de amônio $0,96 \text{ g L}^{-1}$	Mistura com agitador magnético	Aferição do volume final para 100,00 mL

Nas extrações 18 a 21 utilizando soluções de carbonato tiveram como objetivo a precipitação de carbonato de cálcio, facilitando assim a solubilização do íon iodato que é dificultada pela grande quantidade de íon comum (Ca^{2+}) presente nas amostras. Dentre o uso do carbonato de amônio e o carbonato de sódio, a

última opção mostrou ser melhor obtendo uma resposta média de $68,2 \pm 11,7 \%$. Vale destacar que esta resposta com maior eficiência foi obtida como uso de 95,0 mL da solução de carbonato, portanto o aumento do volume do meio gerou uma pequena melhoria.

Também realizou-se o procedimento apresentado na Tabela 12.

TABELA 12 - Procedimento de extração 22 seguido da quantificação do iodo por titulação

22	2,5000	95,0 mL de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$	60 min em banho ultrassom	Aferição do volume final até 100,00 mL
-----------	--------	---	---------------------------	--

No teste 22 utilizou-se solução de citrato de sódio, objetivando a complexação do cálcio, facilitando assim a solubilização do iodato. O experimento gerou uma eficiência média de $75,2 \pm 19,5 \%$, sendo realizado por seis vezes, uma vez que atingiu-se recuperação até $115,5 \%$, valor fora da faixa esperada. Acredita-se que essa alta recuperação pode ter ocorrido devido a reações paralelas entre o tiosulfato e alguns íons que possam ser reduzidos por esse oxidante, tais como ferro(III) e o Selênio (IV) presentes na amostra.¹⁵⁰ Outros interferentes também podem estar presentes na amostra, visto que as matérias-primas utilizadas no preparo dos premixes são de baixa pureza, (cerca de 60 %). Esse resultado errático pode ter ocorrido devido à falta de homogeneidade da amostra.

Dentre os procedimentos realizados percebeu-se que a extração em meio de citrato de sódio (procedimento 22) gerou melhor resultado, porém não foi possível quantificar com exatidão e precisão adequada o teor do analito por meio da titulação iodométrica.

Devido tais inconvenientes decidiu-se realizar testes com as outras técnicas de quantificação (espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff e ICP OES).

3.2.2 Determinação de iodo em amostras de premixes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

As modificações dos procedimentos de Choengchan *et al.* (2003)¹⁴ e Abouhiat *et al.* (2013)⁹⁰ se referem ao uso de cronômetro para marcar o tempo, adição dos

reagentes em bateladas e adição da solução de cério (IV) 1 min após a adição da solução de arsênio (III) na solução amostra ou padrão ou branco. As alterações permitiram que o procedimento pudesse ser aplicado no laboratório e também geraram maior agilidade na aquisição dos resultados.

Por se tratar de um método cinético com tempo fixo utilizou-se o cronômetro de forma bastante atenta, uma vez que o erro de 1 s representa uma alteração significativa na resposta.

Vale destacar que a curva de calibração é decrescente e não linear diretamente, por tanto calculou-se o logaritmo neperiano (\ln) das absorbâncias. Através de testes observou-se que as soluções padrão em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$ nas faixas de concentração $0,01\text{-}0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,10\text{-}1,00 \text{ mg L}^{-1}$ geraram curvas analíticas adequadas, ou seja, com o R^2 acima de 0,99.

Para avaliar possíveis perdas na operação de extração em banho ultrassom procedeu-se análise da solução padrão de iodeto $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de iodo em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, antes e após ser mantida em banho ultrassom por 1 h. Com este teste percebeu-se que tal operação não gerou perda do iodo nesta solução, sendo um indício da eficiência do procedimento.

Também realizou análise solução padrão de iodeto $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de iodo em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, antes e após a filtração a vácuo com membrana de fibra de vidro. Com esse ensaio percebeu-se tal operação não gerou perdas do iodeto presente na solução, uma vez que as concentrações alcançadas antes e após a filtração foram bem próximas. Conclui-se então que a filtração pode ser utilizada neste estudo.

Na amostra de premix 1 foi necessária à redução para permitir a análise, visto que a reação base do método é catalisada pelos íons iodeto.¹¹⁴ Os testes referentes à redução do iodato a iodeto utilizando o ácido ascórbico demonstraram que o tempo de 1 h foi suficiente para a reação se processar, pois apresentou absorbância bastante similar ao teste com 2 h e com a análise das soluções padrão de iodeto. Quanto a concentração da solução de ácido ascórbico, foi observado que $20,00 \text{ mg L}^{-1}$ foi suficiente, uma vez que a absorbância gerada na análise das soluções padrão com iodeto em meio aquoso, soluções padrão com iodato em meio de ácido ascórbico $20,00 \text{ mg L}^{-1}$ e soluções padrão com iodato em meio de ácido ascórbico $28,00 \text{ mg L}^{-1}$ produziram absorbâncias parecidas.

Ao analisar um branco apenas com o ácido ascórbico observou-se uma diminuição da absorbância se comparado ao branco apenas com água purificada, indicando que o ácido ascórbico interferia na análise.¹⁵² Conclui-se que para realização de tal ensaio é necessário o preparo das soluções padrão com iodato de cálcio, uma vez que não se confirmou a completa redução do iodato a iodeto.

Na análise do branco do premix encontrou-se absorbância muito inferior a leitura do branco com água, indicando interferência da matriz e dificultando até mesmo o preparo das soluções padrão em meio ao extrato do branco.

Tanto na análise da amostra de premix 1 simulado (com iodato) quanto do premix 2 (com iodeto) gerou-se absorbâncias baixas com relação às soluções padrão das curvas de calibração, originado em uma concentração muito superior ao esperado. A diluição ainda maior do extrato das amostras, para uma concentração esperada de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ também não possibilitou a análise, pois a absorbância atingida ainda foi baixa com relação a absorbância das soluções padrão, indicando que o problema realmente era de interferência no método, dificultando a realização do ensaio por esta técnica.

É reportado na literatura que este método está suscetível a diversos interferentes, por formação de compostos com o Ce IV e com o As III, por formação de complexos com o Ce IV e por ocorrência de reações paralelas. Os íons e compostos citados como estimulantes da reação (diminuição da absorbância), são os KBr, MgSO_4 , Cl^- , NO_2^- , SCN^- , BrO_3^- , Fe^{2+} . As amostras do estudo possuem óxido de magnésio que tem características químicas similares ao do sulfato de magnésio e, portanto pode ter sido um íon que interferiu no ensaio. Também é sabido que os íons e compostos Ag e Hg, F^- , NaF, KH_2PO_4 , ZnSO_4 , KCl interferem no método causando inibição na reação redox (não diminuindo a absorbância) e nas amostras possui compostos com o zinco com características similares a do sulfato de zinco, podendo também interferir no método. As amostras são produzidas com matérias-primas com baixo teor de pureza (no máximo 60 %) podendo também haver interferentes no método que não são conhecidos.^{31,114}

Visto que o método gera bons resultados para amostras com características diferentes dos premixes (sais de cozinha e amostras biológicas) e devido aos indícios de interferência, decidiu-se partir para os testes usando a técnica de ICP OES.

3.2.3 Determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES

Inicialmente preparou-se e analisou-se a solução padrão de iodato de cálcio a $4,00 \text{ mg L}^{-1}$ de iodo em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, antes e depois da permanência no banho ultrassom durante 1 h. Através desse ensaio percebeu-se que tal operação não provocou perdas na solução testada padrão, logo há indícios da eficiência da operação.

Baseando-se nas curvas de calibração externas utilizadas para determinação de iodo por ICP OES^{6,109}, nas medidas do branco e no coeficiente de correlação de Pearson (R^2) verificou-se que a faixa de concentração de padrão de $2,00\text{-}10,00 \text{ mg L}^{-1}$ produziu curva aparentemente com boa linearidade, portanto selecionou-se tal faixa de concentração para o estudo.

Na avaliação das linhas efetuou-se análise do extrato da amostra e das soluções padrão e percebeu-se que as análises na linha $206,163 \text{ nm}$ eram pouco sensíveis, ou seja, o aumento de concentração gerava pouco aumento do sinal analítico, dificultando até mesmo a construção da curva de calibração. As análises realizadas nas linhas $178,215 \text{ nm}$ e $206,188 \text{ nm}$, não poderiam ser utilizadas uma vez que havia interferência parcial em uma região do espectro que impossibilitava a contabilização do sinal gerado apenas pelo iodo, além do que a análise das soluções padrão não geram adequada curva de calibração. Portanto foi necessário realizar as determinações de iodo nos premixes apenas na linha $182,976 \text{ nm}$, mesmo não sendo a linha com menor sinal de fundo.

3.2.3.1 Otimização das condições operacionais do ICP OES para determinação de iodo

Como o iodo é um elemento de difícil ionização foi realizada otimização da potência, do fluxo de gás de nebulização e da taxa de aspiração da amostra a fim de selecionar uma condição que gere maior sinal analítico. Dessa forma as variáveis foram analisadas em diferentes condições segundo um planejamento composto central, seguindo a matriz de contraste demonstrada na Tabela 13.

13 - Matriz de contraste do planejamento de experimentos

Nº de experimentos	Potência (W)	Fluxo de gás de nebulização (L min ⁻¹)	Taxa de aspiração da amostra (mL min ⁻¹)
1	1100 (-1)	0,6 (-1)	1,9 (-1)
2	1400 (1)	0,6 (-1)	1,9 (-1)
3	1100 (-1)	1,0 (1)	1,9 (-1)
4	1400 (1)	1,0 (1)	1,9 (-1)
5	1100 (-1)	0,6 (-1)	2,6 (1)
6	1400 (1)	0,6 (-1)	2,6 (1)
7	1100 (-1)	1,0 (1)	2,6 (1)
8	1400 (1)	1,0 (1)	2,6 (1)
9	1000 (-1,682)	0,8 (0)	2,3 (0)
10	1500 (1,681)	0,8 (0)	2,3 (0)
11	1250 (0)	0,5 (-1,682)	2,3 (0)
12	1250 (0)	1,1 (1,682)	2,3 (0)
13	1250 (0)	0,8 (0)	1,7 (-1,682)
14	1250 (0)	0,8 (0)	2,7 (1,682)
15	1250 (0)	0,8 (0)	2,3 (0)
16	1250 (0)	0,8 (0)	2,3 (0)
17	1250 (0)	0,8 (0)	2,3 (0)

Fonte: Barros-neto, Scarminio e Bruns (2003)¹²⁴

Na otimização dos parâmetros instrumentais do ICP OES para o iodato gerou-se o modelo matemático, demonstrado pela equação 5 e para o iodeto gerou-se o modelo demonstrado em 6.

$$Y = -142,9010x_2^2 - 55,6440x_3^2 + 89,0367x_2 + 86,8568x_3 + 847,0096 \quad (5)$$

$$Y = -30,0901x_1^2 - 161,1965x_2^2 - 35,3570x_3^2 + 90,2072x_2 + 80,1533x_3 + 50,7625x_1 x_2 + 995,8704 \quad (6)$$

Onde: x_1 representa o fator potência, x_2 representa fluxo do gás de nebulização e x_3 representa a taxa de aspiração da amostra.

A avaliação dos modelos foi realizada por meio dos testes estatísticos, produziram os dados apresentados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - Avaliação do modelo da otimização para o iodato

MQR	MQr	F Calculado (regressão e resíduo)	R ²	MQFaj	MQep	F calculado (falta de ajuste e erro puro)
4,6261x10 ⁴	2,3628x10 ³	19,58	0,9703	2967,25	1154,15	2,57

MQR é a média quadrática da regressão, MQr é a média quadrática dos resíduos, é o coeficiente de correlação de Pearson, MQFaj é a média quadrática da falta de ajuste e a MQep é a média quadrática do erro puro.

TABELA 15 - Avaliação do modelo da otimização para o iodeto

MQR	MQr	F Calculado (regressão e resíduo)	R ²	MQFaj	MQep	F calculado (falta de ajuste e erro puro)
5,1843x10 ⁴	3,3700x10 ³	15,38	0,9625	4817,75	474,56	10,15

MQR é a média quadrática da regressão, MQr é a média quadrática dos resíduos, R² é o coeficiente de correlação de Pearson, MQFaj é a média quadrática da falta de ajuste e a MQep é a média quadrática do erro puro.

O F calculado para avaliação da regressão e dos resíduos compreende a relação da MQR pela MQr. Para o iodato obteve-se valor de 19,58 e para o iodeto encontrou-se 15,38, ou seja, valores muito superiores ao F_{10,6} tabelado para 95 % de confiança que é 4,06. Com este teste pode-se concluir superioridade da regressão em relação aos resíduos e, portanto adequação dos modelos gerados.¹²⁴

Outro teste ANOVA realizado foi com relação à falta de ajuste e erro puro e para isso calculou-se F que foi a relação entre MQFaj e MQep, obtendo-se para o iodato 2,53, já para o iodeto encontrou-se 10,15. O valor de F_{4,2} tabelado para 95 % de confiança é 19,25. Pode-se perceber que os F calculados são inferiores ao valor crítico e, portanto não há indícios de falta de ajuste, mostrando que os modelos estão adequados.¹²⁴

Vale ressaltar que os valores do coeficiente de correlação para o iodeto foi 0,9703 e para o iodato 0,9625, ou seja, se tratam de resultados fortes e positivos, mostrando a dependência entre o sinal analítico e as variáveis analisadas. Logo pode-se considerar que os modelos possuem boa linearidade.¹²⁷

Ao dividir os níveis codificados no intervalo utilizado nos planejamentos por um pequeno valor e os substituir nas equações geradas pelo estudo, observa-se as tendências das respostas, que podem ser demonstrados na forma de gráficos como os apresentados nas figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

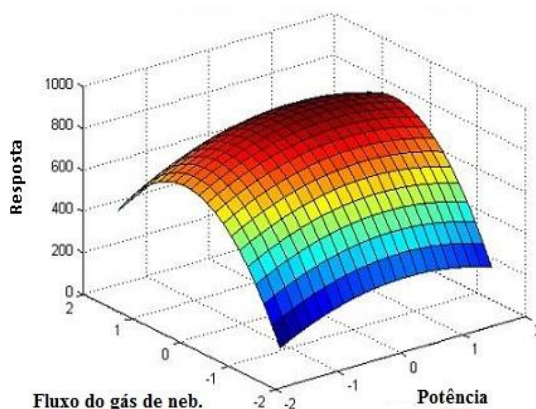


FIGURA 4 - Superfície de resposta referente ao fluxo do gás de nebulização e a potência para o iodato

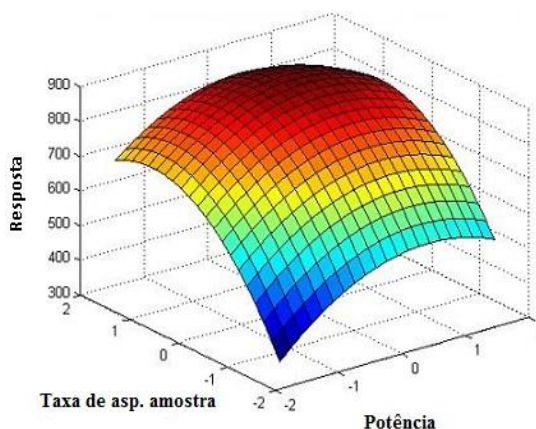


FIGURA 5 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração e a potência da amostra para o iodato

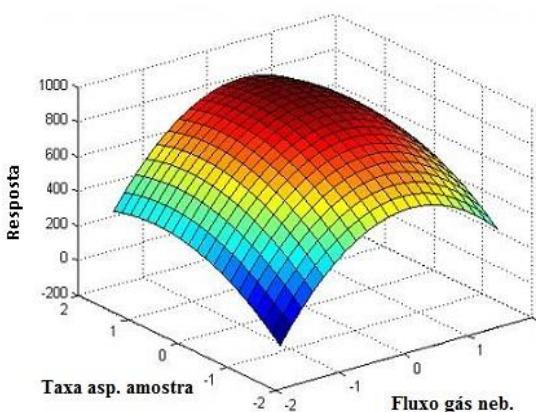


FIGURA 6 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração da amostra e o fluxo do gás de nebulização para o iodato

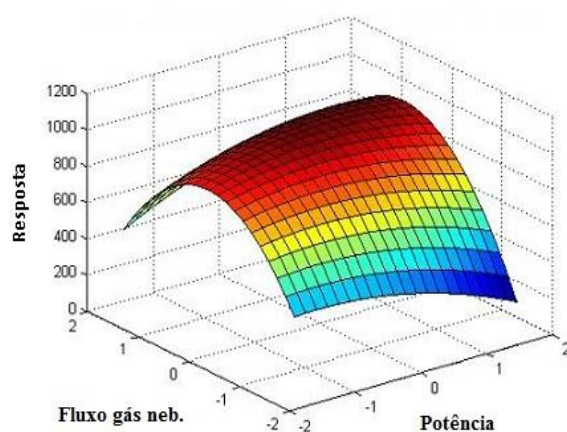


FIGURA 7 - Superfície de resposta referente o fluxo do gás de nebulização e a potência para o iodeto

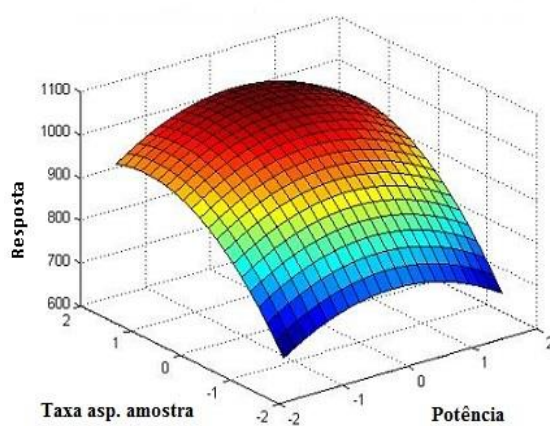


FIGURA 8 - Superfície de resposta referente taxa de aspiração da amostra e a potência e a para o iodeto

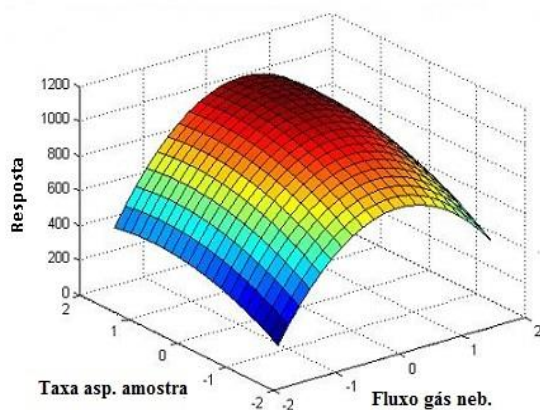


FIGURA 9 - Superfície de resposta referente a taxa de aspiração e ao fluxo do gás de nebulização da amostra para o iodeto

Nos gráficos apresentados acima (Figuras 4 - 9) os valores referentes aos parâmetros avaliados estão codificados, porém os valores de respostas estão apresentados com intensidade dos sinais gerados. Quanto mais próximas do azul

escuro menores são as respostas e quanto mais próximas do vermelho escuro mais alto são as intensidades geradas, estando a resposta máxima, mais conhecida como ponto crítico, compreendido na última região citada.

O cálculo das respostas críticas foi realizado com a deriva das equações geradas formando sistemas com três equações e três incógnitas, utilizando o método de Newton para achar o valor correspondente às três incógnitas. Os valores encontrados para x_1 , x_2 e x_3 estavam codificados e ao decodificá-los em relação aos valores utilizados nos experimentos, encontrou-se para análise da solução padrão com iodato de cálcio a potência de 1307 W, o fluxo do gás de nebulização de 0,89 L min⁻¹ e a taxa de aspiração da amostra de 2,42 L min⁻¹, já no caso do iodeto de potássio resultou em uma potência de 1315 W, fluxo do gás de nebulização 0,90 L min⁻¹ e a taxa de aspiração da amostra em 2,62 mL min⁻¹, mostrando que as respostas foram similares para os dois íons.

Com esses resultados consegue-se perceber que as condições a serem usadas para análise do iodo na forma de iodato é semelhante às utilizadas no iodo na forma de iodeto, assim como esperado.

Na análise por ICP OES a amostra ao chegar ao plasma passa pelos processos de volatilização, dessovatação, atomização e neste caso os átomos isolados se encontram no estado elementar.¹⁰⁵ Desse modo o estado de oxidação que se apresentam os analitos não interferem nos próximos processos ocorridos no equipamento, cabendo a resposta do padrão de iodo na forma de iodeto ou iodato apresentarem sinal analítico similar, havendo diferenciações provenientes de erros experimentais, de diferenças nas concentrações do analito e variações nas condições operacionais do equipamento.

3.2.3.2 Testes de preparo da amostra do premix 1 com quantificação por ICP OES

As análises foram realizadas na curva externa, pois a sensibilidade (coeficiente angular das retas) dessa curva e a de adição de analito eram similares.

O resultado alcançado na extração com 2,0000 g da amostra em meio a solução de citrato de sódio 2,58 g L⁻¹ foi 82,3 ± 11,6 %, já para a solução de ácido cítrico 1,92 g L⁻¹ foi 74,2 ± 8,2 %. A análise com o premix comercial demonstrou uma

eficiência de extração de $71,5 \pm 9,5 \%$, mostrando compatibilidade entre a amostra simulada e a comercial. Visto que o desvio padrão foi alto e similar na amostra comercial e na amostra simulada pode-se concluir que grande parte desse erro é característico da própria amostra, por isso o valor apresentado no rótulo é referente a uma concentração mínima e não a um valor exato. Vale ressaltar que a eficiência da extração pode ter sido prejudicada pela pequena massa da amostra utilizada no procedimento.

Ainda com o premix iodato realizou-se extração utilizando utilizou-se 20,0000 g da amostra em solução citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$ obtendo $84,1 \pm 4,3 \%$ de resposta. Para o procedimento similar, porém com extrações consecutivas alcançou-se $90,8 \pm 7,9 \%$ da concentração. Dessa forma pode-se concluir que o procedimento de extrações consecutivas foi um pouco mais eficiente, porém por demandar muito tempo ficaria inviável a utilização em rotina.

Selecionou-se como a melhor condição testada neste estudo com o premix iodato seguido da quantificação por ICP OES: 20,0000 g da amostra, em meio 900,0 mL da solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, mantendo-se 1 h em banho ultrassom, seguido de filtração, aferição do volume até 1000,00 mL com a solução de citrato de sódio, homogeneização da solução e por fim, diluição do extrato.

3.2.3.3 Testes de preparo da amostra do premix 2 com quantificação por ICP OES

Para o premix iodeto decidiu-se usar quantidades maiores da amostra na extração, uma vez que há trabalhos recentes com matrizes similares que retratam a necessidade de 10 e 25 g para eliminar o problema da heterogeneidade da matriz.^{9,83} O resultado da extração em meio aquoso com 10,0000 g da amostra foi em média $61,5 \pm 4,9 \%$, com o uso do TMAH 0,01% foi $64,7 \pm 8,7 \%$, com o hidróxido de amônio 0,01 % $57,2 \pm 12,6 \%$ e com solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$ foi $85,6 \pm 8,7 \%$.

O TMAH e o hidróxido de amônio foram utilizados em baixa concentração para que o pH não ultrapassasse 8, pois acima desse pH as soluções podem deteriorar os acessórios de vidro e quartzo do ICP OES.⁶

Também realizou-se procedimento com 20,0000 g da amostra em meio solução de TMAH 0,01 % obtendo $68,0 \pm 10,4 \%$ do esperado. Para extração com

20,0000 g da amostra em meio à solução de citrato de sódio encontrou-se $87,0 \pm 3,3$ %. Portanto conclui-se que o aumento da massa apresentou uma melhora em alguns casos e para garantir uma melhor homogeneidade dos resultados optou-se por utilizar a alíquota de 20,0000 g da amostra.

Como método proposto para o premix iodeto optou-se pela extração de 20,0000 g da amostra com 450,0 mL da solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$, mantendo a mistura em banho ultrassom 35 min, seguido de filtração, aferição do volume até 500,00 mL com a solução de citrato, homogeneização da solução e por fim, diluição do extrato e análise por ICP OES.

3.2.3.4 Avaliação da qualidade dos métodos de determinação de iodo em amostras de premixes usando ICP OES

Foi realizado teste analisando as soluções padrão da curva de calibração (iodeto em meio a solução de citrato de sódio $2,58 \text{ g L}^{-1}$) antes e depois de três dias no congelador. As soluções foram liquefeitas a temperatura ambiente e com os resultados pode-se observar que as intensidades das leituras das soluções de ambas as curvas geraram intensidades similares.

Visto que desenvolveu métodos distintos para a determinação de iodo nas amostras de premixes com iodato e com iodeto, realizaram-se os testes de características de desempenho separadamente.

3.2.3.4.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método foi feita leitura dos brancos de amostra e de calibração sendo aplicado o teste F. O F calculado foi 2,42 e como o $F_{5,5}$ crítico para 95 % de confiança é 5,05, pode-se aplicar o teste T para variâncias equivalentes obtendo T calculado de 1,11, já o T_{12} tabelado com 95 % de confiança é 1,78. Com esse ensaio pode-se afirmar que as intensidades geradas por ambos os brancos possuem variâncias e médias similares, portanto o método é considerado seletivo.

Visto que a faixa de concentração usada nos demais testes também produzia curvas adequadas nas condições selecionadas para os métodos, continuou-se utilizado o intervalo de concentração de 2,00-10,00 mg L⁻¹ de iodo.

Para confirmar a não existência de efeitos de matriz preparou-se e analisou-se curvas de adição de analito e curvas externas. Em seguida foi calculado o F que consistiu na relação entre a maior e a menor variância em cada nível de concentração da curva de calibração. Na Tabela 16, demonstra-se tais valores.

TABELA 16 - Teste F para seleção da curva de calibração do método de determinação de iodo em amostras de premixes por ICP OES

Concentração (mg L ⁻¹)	F calculado para a curva com iodato	F calculado para a curva com iodeto
2,00	2,70	5,34
4,00	4,19	2,72
6,00	1,61	1,01
8,00	1,83	10,36
10,00	5,09	2,40

Como o F_{2,2} tabelado para 5 % de significância é 19,00 e todos os F calculados foram inferiores a esse valor, pode-se afirmar que as respostas nas curvas de calibração externa e com adição de analito são similares, logo constatou-se que não há efeitos de matriz significativos.¹³⁵

3.2.3.4.2 Linearidade

A curva de calibração externa média e com adição de analito média para as soluções padrão com iodato estão apresentadas na Figura 10, já para as soluções padrão com iodeto estão apresentadas na Figura 11.

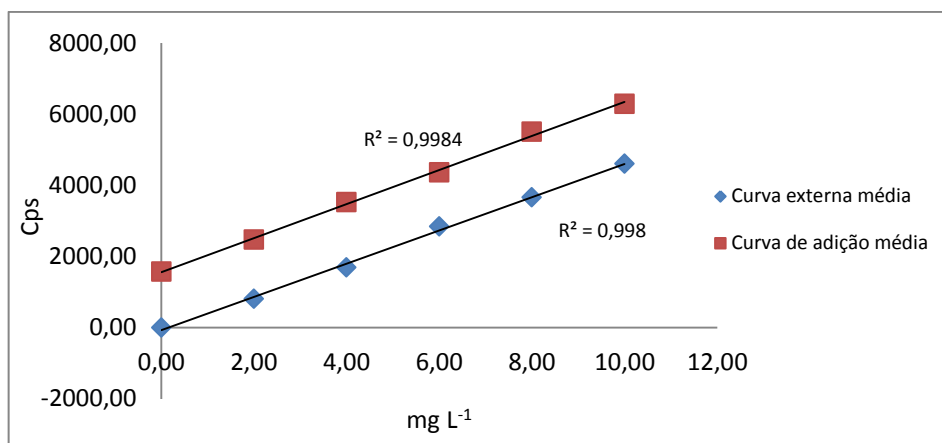


FIGURA 10 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodato) nas amostras de premixes por ICP OES

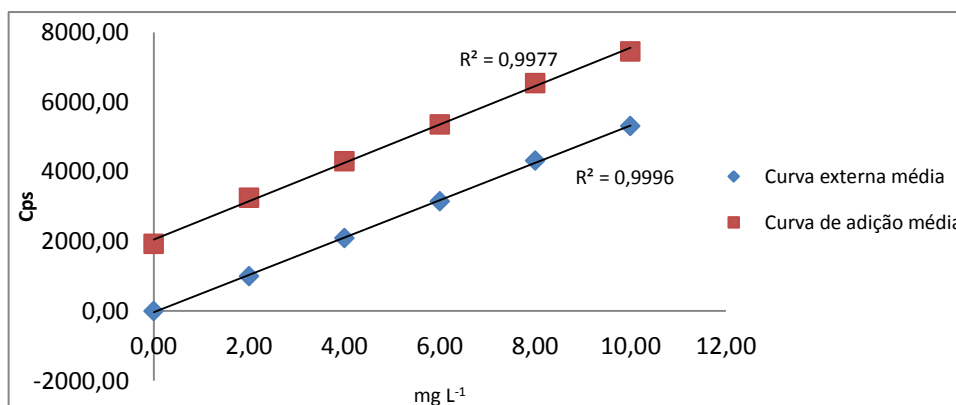


FIGURA 11 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de premixes por ICP OES

Como apresentado na figura 10, a curva de calibração externa média referente a análise das soluções padrão com iodato gerou R^2 de 0,9982, já a curva de calibração com adição de analito média gerou R^2 de 0,9984. Como apresentado na figura 11, a curva de calibração externa média referente a análise das soluções padrão com iodeto gerou R^2 de 0,9996, já a curva de calibração com adição de analito média gerou R^2 de 0,9977. Percebe-se que todos os R^2 são acima de 0,99, ou seja, valores altos e próximos de 1,0000. Pode-se então concluir que os modelos gerados possuem boa linearidade.

As demais avaliações e ensaios abaixo referem-se às curvas de calibração externa.

A sensibilidade média (coeficiente angular das retas) é 490,35 e sabe-se que quanto maior é a sensibilidade do método menores variações de concentração são

percebidas. Este valor geralmente é utilizado como parâmetro para comparação entre métodos.²⁴

Outra forma de avaliar a curva de calibração foi por meio do teste ANOVA da regressão em que o valor calculado é a reação entre a soma quadrática da regressão e a soma quadrática dos resíduos. O F calculado no modelo com padrão de iodato foi 5199,56 e no modelo com padrão de iodeto foi 6712,67 sendo estes valores muito superiores ao $F_{1,16}$ para 95 % de confiança que é 4,49. Isto prova a superioridade da regressão com relação aos resíduos e a diferença dos sinais analito nos diferentes níveis das calibrações realizadas.^{127,133}

Na avaliação dos resíduos de ambas as calibrações (com iodato e com iodeto) percebeu-se aleatoriedade assim como apresentado na Figura 12 e 13.¹³¹

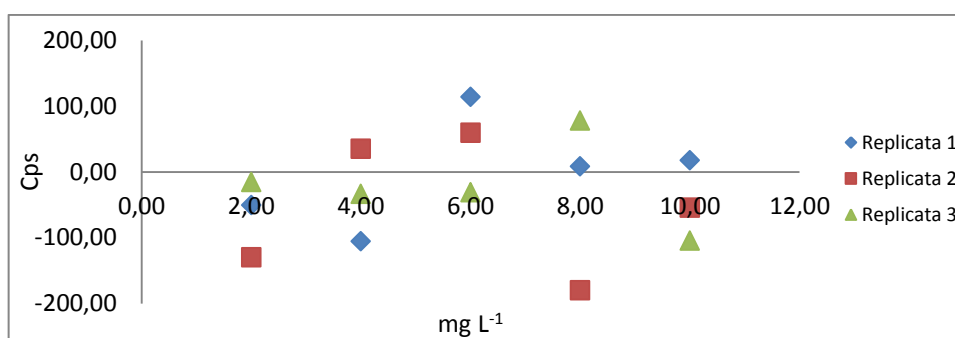


FIGURA 12 - Resíduos da curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodato) nas amostras de premixes por ICP OES

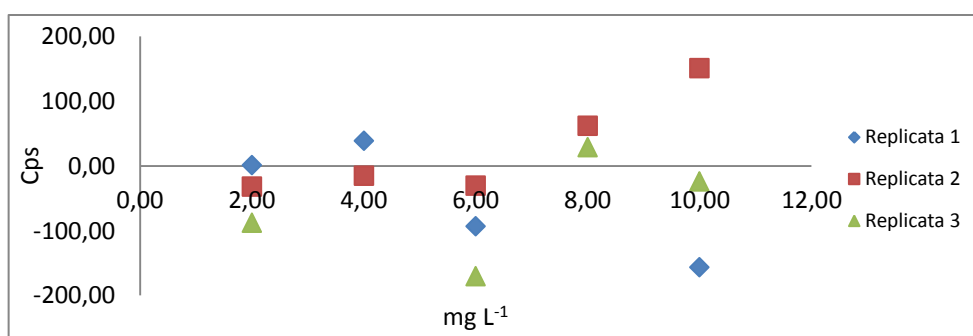


FIGURA 13 - Resíduos da curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de premixes por ICP OES

Aplicou-se também o teste de Cochran que consiste na relação entre a maior variância e a soma das variâncias totais geradas em todos os níveis de calibração. O valor gerado para a curva com soluções padrão contendo iodato foi 0,438, já para curva com soluções padrão contendo iodeto foi 0,467. O $C_{3,5}$ para 95 % de confiança

é 0,684, portanto pode-se considerar ambos os modelos como homocedásticos, ou seja, com uma variância similar nos diversos níveis de concentração da curva de calibração. Portanto está adequada a utilização do método de mínimos quadrados para confecção dos modelos de calibração.^{24,148}

3.2.3.4.3 Efeito de memória

Em determinações de iodo pode-se verificar um aumento do sinal gerado de acordo com o tempo, ocasionando erro nas medidas. Isso ocorre quando há a formação de moléculas de iodo que absorvem/adsorvem nas mangueiras, tubos e acessórios do equipamento, portanto este fenômeno deve ser investigado.¹¹¹

Neste estudo avaliou-se o efeito de memória pela análise de solução de calibração e solução padrão intercaladamente. Obteve-se baixo desvio na análise da solução padrão em relação à grandeza do resultado, provando que não houve grande flutuação nos resultados da solução padrão. Notou-se também que os valores das intensidades das leituras dos brancos se mantiveram baixos mesmo após a aspiração da solução padrão. Portanto não identificou-se tal efeito.

3.2.3.4.4 Robustez do plasma

A relação gerada pelos resultados das análises da amostra nas linhas I (280 nm) e II (285 nm) do magnésio foi $8,85 \pm 0,18$. Como o valor está acima de 8 pode-se confirmar que as condições analíticas utilizadas foram adequadas, gerando boa estabilidade do plasma.¹³⁸

3.2.3.4.5 Exatidão e Precisão

Também foi avaliado o método segundo a exatidão, através da recuperação e da precisão (repetitividade) por meio do coeficiente de variação ao analisar os premixes simulados 1 (iodato) e 2 (iodeto). Os resultados das análises se encontram nas Tabelas 17 e 18.

TABELA 17 - Avaliação da exatidão dos métodos de determinação de iodo nas amostras de premixes simulados

Premix 1	Premix 2
Recuperação (%)	Recuperação (%)
87,3	93,3
79,0	81,5
90,8	86,0

TABELA 18 - Avaliação da precisão dos métodos de determinação de iodo nas amostras de premixes simulados

	Premix 1	Premix 2
	Concentração em mg kg ⁻¹	Concentração em mg kg ⁻¹
Média	856,7	869,2
CV^Δ	7,04	6,82

^ΔCoeficiente de variação

*resultado esperado 1000,0 mg kg⁻¹

Os resultados da avaliação de exatidão apresentaram-se de 79,0 - 90,8 % para os premixes com iodato, e 81,5 - 93,3 % para os premixes com iodeto. Acredita-se que esses valores foram obtidos devido aos deslocamentos de equilíbrios na complexa composição da amostra, dificultando a solubilização do analito. Também é possível a intercorrência de reações entre os íons presentes no extrato das amostras, provocando pequenas perdas no momento da sonicação e da filtração.

Outros problemas que também possam ter ocorridos se referem à etapa de simulação e homogeneização da amostra. Como ela foi macerada em gral e pistilo de porcelana pode-se ter perdas por agregação nos poros do material.

Quanto a variação nos resultados acredita-se que seja proveniente de erro operacional na homogeneização do material, somada ao erro experimental proveniente de vidrarias, equipamento e analista.

3.2.3.4.6 Análise das amostras comerciais

As análises das amostras geram as recuperações e desvios apresentados nas Tabelas 19 e 20.

TABELA 19 - Recuperações das análises das amostras de premixes comerciais

Premix 3	Premix 4
Tendência (%)	Tendência (%)
83,3	85,7
89,1	73,4
76,7	89,4

TABELA 20 - Desvios das análises das amostras de premixes comerciais

	Premix 3	Premix 4
	Concentração em mg kg ⁻¹	Concentração em mg kg ⁻¹
Média	992,9	994,2
CV^A	7,5	10,1

^ACoeficiente de variação

*resultado esperado 1250,0 mg kg⁻¹

Os resultados encontrados das amostras comerciais e simuladas são similares provando mais uma vez eficiência na produção do premix simulados. Os desvios também se mostraram relativamente altos em relação às concentrações trabalhadas, fato este que comprova a heterogeneidade das amostras de premixes.

CAPÍTULO 4
DETERMINAÇÃO DE
IODO EM AMOSTRAS DE
SOLUÇÕES
EXPECTORANTES

4. DETERMINAÇÃO DE IODO NAS SOLUÇÕES EXPECTORANTES

O muco é um composto viscoso e elástico que é produzido por células caliciformes, sendo composto por uma mistura de glicoproteínas e proteoglicanas e água. Essa secreção tem como objetivo manter as condições fisiológicas do aparelho respiratório e isso ocorre devido a diversas funções indiretas, tais como: barreira física e biológica para os elementos estranhos, ação imunológica de defesa do trato respiratório, umidificador do ar inspirado, diluição das substâncias inaladas e depuração biológica.¹⁵³

Os expectorantes são administrados na forma oral (xaropes) e em geral têm como objetivo a redução da viscosidade e adesividade do muco, a fim de melhorar a sua remoção, seja pela tosse, pela drenagem ou por meios mecânicos, porém muitos deles têm sido usados há séculos e não tem estudos que comprovem a eficácia.¹⁵³⁻¹⁵² Há relatos que o uso desses medicamentos podem estimular a secreção do trato respiratório e podem ativar formas latentes de tuberculose.¹⁵²

O xarope é uma fórmula aquosa com alta viscosidade, que possui no mínimo de 45 % (g g^{-1}) de sacarose ou outros açúcares na sua composição, tendo geralmente aromatizantes, corantes e conservantes.¹⁵³

O xarope de iodeto de potássio é usado em casos de enfermidades do trato respiratório, tais como: bronquites, traqueo-bronquites, asma brônquica, doenças pulmonares e bronquiectasia e age como “expectorante irritante”, ou seja, causa aumento da fluidez das secreções e irritação do trato respiratório estimulando a tosse e por consequência expulsão do muco. Os efeitos colaterais relatados são hipotireoidismo, hipertireoidismo, iodismo (intoxicação por iodeto), simulação de resfriado, irritação ocular e até edema pulmonar, mas ressalta-se que esses problemas geralmente aparecem com o uso em um grande período, caso comum nesse medicamento, uma vez que se tratar de medicamento de venda livre, com baixo custo, além do que os xaropes apresentam altos teores do princípio ativo.^{3,154} Também é relatado casos de alergia aos xaropes de iodeto de potássio sendo que os sintomas desaparecem cerca de 24 h depois do tratamento com corticoide e o abandono do uso da solução expectorante.¹⁵⁵

Esse medicamento também pode ser usado com o objetivo de suplementar os teores de iodo caso a alimentação seja empobrecida de tal nutriente, podendo evitar alguns tipos de hipotireoidismo bórico e até mesmo hipertireoidismo.³

A ANVISA é o órgão brasileiro responsável pela regulamentação e fiscalização dos setores e empresas relacionados a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população humana.⁴ Logo há diversas leis e resoluções criadas pela ANVISA que regem a produção de medicamentos e nelas retratam-se que para registro de medicamentos, principalmente os de referência e os genéricos é necessário uma série de estudos de eficácia, de estabilidade entre outros, os quais a análise química faz parte.^{4,156-158} Também há a exigência de controle de qualidade dos medicamentos produzidos, cabendo as farmácias magistrais, indústrias ou laboratórios terceiros a realização de diversas análises, tais como o ensaio de teor.

Devido tais exigências há a necessidade do desenvolvimento de métodos de determinação de iodo nos xaropes, cabendo à empresa e os analistas avaliarem os métodos existentes a fim de selecionar o mais vantajoso em cada caso.

4.1 Parte experimental

Esta parte do trabalho refere-se à aplicação do novo procedimento de determinação de iodo pelo método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff na determinação de iodo em amostras de xaropes. Também ao desenvolvimento de método de determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES. Foi avaliada algumas características de desempenho de ambos os métodos.

4.1.1 Instrumentação

Para o preparo de amostras foram usados banho ultrassom Thornton[®] T14 com frequência de onda fixa e pHmetro MS Tecnocon equipamentos de laboratório[®] mpa-210.

A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema de deionização Quimis[®] Q180 seguido de um sistema de osmose reversa Quimis[®] Q342.

Os experimentos por espectrofotometria UV-VIS foram realizados no equipamento Pró-análise® 100 com o auxílio de um cronômetro digital Vollo®.

Os experimentos por ICP OES foram realizados em um equipamento Optima 7000, Perkin Elmer®, com dupla visão, equipado com *shear gas* (sistema de remoção da zona fria do plasma), detector em estado sólido (CCD), sistema pré-óptico com purga, possibilitando a análise em comprimentos de onda na faixa do VUV.

4.1.2 Materiais e reagentes

Para a solução padrão de iodo utilizou-se iodeto de potássio P.A. Sigma-Aldrich®.

Nas soluções de descontaminação das vidrarias foram utilizados ácido nítrico P.A. Dinâmica Química Contemporânea® e ácido clorídrico P.A. Vetec®.

Para as análises espectrofotométricas foram usados óxido de arsênio (III) P.A. A.C.S. Sigma-Aldrich®, sulfato de cério (IV) P.A. A.C.S. Sigma-Aldrich®, ácido sulfúrico P.A. A.C.S. Sigma Aldrich® e hidróxido de sódio P.A. F. Maia®.

Para a avaliação da robutez do método por ICP OES utilizou-se TMAH P.A. Vetec® e ácido nítrico P.A. Dinâmica Química Contemporânea®.

4.1.3 Soluções padrão

As soluções padrão foram preparadas com o iodeto de potássio e na concentração de 100,00 mg L⁻¹ de iodo em meio aquoso, seguido da diluição com o mesmo solvente.

As soluções padrão não foram estocadas, ou seja, eram preparadas no momento da análise.

4.1.4 Preparo do material e vidrarias

Todas as vidrarias e tubos de falcon[®] utilizadas nas análises foram lavados com detergente e seguido da permanência em banho de ácido nítrico (Dinâmica Química Contemporânea[®]) e clorídrico (Vetec[®]) 2,5 % de cada componente, por 24 h e enxaguado com água purificada.

Todas as vidrarias e materiais foram secos dentro de um recipiente fechado para evitar contaminação.

Os tubos falcon[®] utilizados foram envolvidos em papel alumínio para preservar as soluções e amostras do contato com a luz.

4.1.5 Amostras

Analísaram-se os xaropes de iodeto por serem medicamentos bastante consumidos e que necessitam de controle de qualidade, segundo exigência da ANVISA.

As quatro amostras de xarope de marcas distintas, foram adquiridas em farmácias locais, e dentre elas não possuíam grandes variações na composição tendo, segundo a bula, 100 mg de iodeto de potássio a cada 5 mL do medicamento. Todas continham corantes e aromatizantes e algumas tinham extrato de plantas.

Os brancos das amostras foram xarope base de sorbitol e xarope base de sacarose e compreendem amostras manipuladas isentas do analito.

As amostras foram preparadas e analisadas em seguida.

4.1.6 Determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Essa parte do trabalho refere-se à verificação da possibilidade de determinação de iodo nos xaropes pelo método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff. Este método foi selecionado devido a eficácia na aplicação para amostras

similares ao xarope (suplementos)⁹⁰. Também foi verificada a qualidade do método por meio do estudo de alguns parâmetros e validação.

O procedimento de Sandell-Kolthoff referente a esta seção é similar ao utilizado nas análises dos premixes, alterando-se apenas a etapa de preparação de amostra.

Para as análises por este método foi necessário o preparo da solução de cério (IV) que consistiu em 0,42 g de sulfato de cério (IV) solubilizado em 200,0 mL de água e 6,3 mL de ácido sulfúrico, prosseguindo com a aferição do volume para 250,00 mL utilizando água.¹⁴

Para o preparo da solução de arsênio (III) foi usado 1,00 g do óxido de arsênio (III) e 1,50 g do hidróxido de sódio em 200,0 mL de água, seguido da adição de 6,0 mL de ácido sulfúrico e água até completar 250,00 mL.¹⁴

O método se processou com o uso de 500 µL dos xaropes preparados, soluções padrão ou brancos das amostras preparados, mais 1,00 mL da solução de arsênio e após 1 min dessa mistura houve a adição de 1,00 mL da solução de cério. Após 1 min da última adição fez-se a medida em espectrofotômetro a 420 nm. O tempo foi marcado pelo cronômetro.¹⁴

As curvas de calibração foram preparadas através da análise das soluções padrão, sendo registradas no eixo x: (0,10; 0,25; 0,50; 0,75) mg L⁻¹ de iodeto e no eixo y o logaritmo neperiano (ln) das absorbâncias a 420 nm em um tempo reacional de 1 min.

4.1.6.1 Preparo das amostras de xaropes para determinação de iodo pelo método espectrofotométrico UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Para as análises dos xaropes foram realizadas diluições consecutivas em meio aquoso chegando a concentração de 0,50 mg L⁻¹ de iodo. Após as diluições, mantiveram-se as soluções em banho ultrassom por 10 min, seguido da adição dos reagentes e leitura em espectrofotômetro de acordo com procedimento do método Sandell-Kolthoff.

4.1.6.2 Desenvolvimento de método e avaliação da qualidade do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Inicialmente para verificar a possibilidade da análise, foi preparada e analisada uma curva de calibração (0,10-1,00 mg L⁻¹ de iodo), seguindo de uma amostra de xarope branco e outra de xarope comercial. Esse resultado foi comparado com as informações contidas no rótulo. Posteriormente realizou-se a avaliação do método, através do estudo de diversos parâmetros de validação.

4.1.6.2.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram realizadas análises dos brancos da amostra com sacarose, brancos da amostra com sorbitol e brancos de calibração (água ultrapura), seguido da aplicação do teste ANOVA. Realizou-se seis replicatas para cada branco. Através desse ensaio pode-se averiguar a similaridade entre as respostas.^{129,130}

4.1.6.2.2 Faixa de trabalho e linearidade

Por meio de testes com soluções padrão foi selecionada uma faixa de concentração em que o método pode ser aplicado, baseando-se na qualidade da curva de calibração, inicialmente através do seu coeficiente de correlação de Pearson (R²).²⁴

Após seleção da faixa de trabalho preparou-se e analisou-se a curva de calibração externa em triplicata. A verificação da qualidade da curva gerada também foi examinada através do R², do teste ANOVA da regressão, do gráfico dos resíduos. A homocedasticidade do modelo foi conferida pela aplicação do teste estatístico de Cochran.^{24,131,148}

4.1.6.2.3 Exatidão e precisão

Para mensurar a exatidão e da precisão (repetitividade), foram preparadas e analisadas em triplicata as soluções padrão em meio a branco da amostra, nos três níveis de concentração: 0,30 (baixo); 0,60 (médio); 0,90 (alto) mg L⁻¹ de iodo.

Na avaliação da exatidão foram calculadas as porcentagens de recuperação, já para a precisão foram calculados os CVs.¹³²

4.1.6.2.4 Robustez

Na avaliação desse parâmetro de validação foi analisada uma amostra de xarope, utilizando a solução de cério (IV) usada para os demais ensaios e também foram realizadas similares análises usando solução de cério prepara com sulfato de cério (IV) P.A. Vetec[®], ou seja, reagente de marca e grau de pureza distinta. O ensaio foi realizado com cinco replicatas reais com cada reagente. Para verificar a similaridade entre as respostas geradas com as duas soluções de cério, aplicou-se teste F, seguido do teste T.^{131,136}

4.1.6.2.5 Análise das amostras comerciais

Para afirmar a aplicabilidade do método proposto em amostras reais, analisou-se os xaropes comerciais 1, 2, 3 e 4.

4.1.7 Determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES

Esta seção refere-se à verificação da possibilidade de determinar iodo nos xaropes por ICP OES. Na literatura é demonstrado aplicações dessa técnica a outros tipos de amostras, encontrando bons resultados em concentrações não muito baixas (acima de 1,00 mg L⁻¹)^{6,109,110}, ou seja, concentrações condizentes com

amostra de xarope preparada (diluída). Outro fator importante na seleção da técnica foi à disponibilidade do equipamento.

Também foi verificada a qualidade do método aplicado por meio do estudo de alguns parâmetros de validação.

Nas análises por ICP OES as amostras e as soluções padrão de iodo na forma de iodeto de potássio foram preparadas em meio aquoso. As curvas de calibração foram preparadas nas concentrações 0,00; 2,29; 4,59; 6,88, 9,17; 11,47 mg L⁻¹ de iodo.

As condições utilizadas no ICP OES são as contidas na Tabela 21, já a potência, fluxo de gás de nebulização e taxa de aspiração da amostra utilizou-se as condições otimizadas para a solução com iodeto.

TABELA 21 - Condições operacionais do ICP OES para análise das amostras de xaropes

Parâmetros	Condições
Visão	Axial
Nebulizador	Gemcone alto teor de sólidos dissolvidos
Câmara de nebulização	Ciclônica para aquosos
Purga do sistema pré-óptico	Alta
Fluxo do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0*
Fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,50*
Potência (W)	1315
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,90
Comprimento de onda (nm)	178,215
	189,215
	206,163
	206,188

*de OLIVEIRA, A. A.(2009)⁶

Inicialmente realizou-se análise de uma amostra de xarope, branco de xarope, soluções padrão e branco de calibração nas quatro linhas espectrais disponíveis no ICP OES para a determinação de iodo. A avaliação dos comprimentos de onda foi baseada na existência de interferentes espectrais e na intensidade do sinal gerado.

4.1.7.2 Preparo das amostras de xaropes para determinação de iodo pelo método em ICP OES

Para as análises dos xaropes foram realizadas diluições em meio aquoso até a concentração de $4,59 \text{ mg L}^{-1}$ de iodo e após tais operações manteve-se as soluções em banho ultrassom por 10 min.

4.1.7.3 Avaliação da qualidade do método determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES

Para verificar a qualidade do método desenvolvido foram realizados estudos de diversos parâmetros de validação.

4.1.7.3.1 Seletividade

Na verificação do efeito de matriz foram realizadas análises dos brancos da amostra com sacarose, brancos da amostra com sorbitol e brancos de calibração (água ultrapura), seguido da aplicação do teste ANOVA para avaliação da similaridade entre as respostas. As análises foram realizadas em seis replicatas reais para cada branco.^{129,130}

Outra forma de avaliar a seletividade foi por meio da análise das curvas de calibração com adição de analito e curvas de calibração externa, seguido do teste F aplicado em cada nível de concentração. Através desse ensaio foi possível investigar a compatibilidade entre as variâncias das soluções padrão com e sem a amostra. A curva de calibração externa foi preparada em triplicata nas concentrações de 0,00; 2,29; 4,59; 6,88; 9,17; 11,47 mg L^{-1} de iodo. As soluções padrão das curvas de calibração com adição de analito também foram preparados em triplicata e nas mesmas concentrações das soluções padrão da curva externa, mas também sofreram adição da alíquota de uma amostra comercial.

4.1.7.3.2 Linearidade

A curva externa (em triplicata) preparada para o teste de seletividade também serviu para avaliação da linearidade. Para isso foi verificado o R^2 , ANOVA da regressão, gráfico dos resíduos e homocedasticidade através do teste de Cochran.^{24,131,148}

4.1.7.3.3 Efeito de memória

Na avaliação do efeito de memória foram realizadas análises intercaladas da solução de calibração de 4,59 mg L⁻¹ de iodo e do branco, verificando se houve aumento da intensidade, principalmente do branco.⁶ Neste teste realizou-se cinco medidas de cada solução/solvente.

4.1.7.3.4 Robustez

O primeiro ensaio foi com relação à robustez do plasma e para isso foram preparadas soluções do xarope comercial 1 (cinco replicatas) sendo adicionada alíquota da solução padrão de magnésio, obtendo a concentração de 0,50 mg L⁻¹. Foram realizadas as leituras dessas soluções utilizando as linhas 280 (I) e 285 nm (II), seguido do cálculo da relação entre a intensidade da linha (I) pela linha (II).¹³⁸

Outro ensaio de robustez realizado referiu-se a análise da solução padrão de iodo (4,00 mg L⁻¹) com pH 5,5; 7,0 e 8,0. Para o ajuste do pH para 8,0 utilizou-se TMAH 25 % e para ajuste do pH para 5,5 utilizou-se ácido nítrico P.A. Esse ensaio foi realizado em triplicata e com objetivo de avaliar se tais alterações no pH da amostra trariam alterações no ensaio.¹³⁶

4.1.7.3.5 Exatidão e precisão

Para mensurar a exatidão e a precisão (repetitividade), preparou-se e analisou-se soluções do padrão com o branco das amostras em três concentrações:

4,00 (nível baixo); 7,00 (nível médio); 10,00 (nível alto) mg L^{-1} de iodo. Esse ensaio foi realizado com triplicatas reais em cada nível.

Na avaliação da exatidão calculou-se a % de recuperação e na precisão calculou-se os CVs.¹³²

4.1.7.3.6 Análise das amostras

Para verificar a aplicabilidade do método foram realizadas análises das soluções expectorantes comerciais 1, 2, 3 e 4.

4.2 Resultados e discussões

O analito presente na amostra está na forma de iodeto de potássio livre em meio à solução aquosa de sacarose ou sorbitol. Visto isto é possível a preparação da amostra por diluição em meio aquoso para então determinação por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff e por ICP OES.^{7,90,91,159,159}

4.2.1 Determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Como sabia-se que as faixas de 0,01 - 0,10 e 0,10 - 1,00 mg L^{-1} de iodo em meio a solução de citrato de sódio utilizada nos testes dos premixes, produziram curvas de calibração com bons coeficientes de correlação (R^2), decidiu-se testar o intervalo de 0,10 - 1,00 mg L^{-1} de iodo na forma de iodeto em meio aquoso e verificou-se que a curva aparentemente também foi adequada, podendo utilizar esse intervalo nas análises do xarope.

Inicialmente realizou-se análise do branco da amostra e de uma amostra de xarope comercial, encontrando para o branco, absorbância próxima a gerada pela análise do branco de calibração. No ensaio com a amostra obteve-se valor próximo

ao informado no rótulo, comprovando a possibilidade da análise nas condições previamente estipuladas.

Vale ressaltar que devido à diluição das amostras não houve interferência devido a coloração e a quantidade de matéria orgânica presente nas amostras.

4.2.1.2 Avaliação da qualidade do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

4.2.1.2.1 Seletividade

Na avaliação desse parâmetro realizaram-se análises do branco de calibração e de amostra (xarope base com sorbitol e xarope base com sacarose), seguido do teste ANOVA. Para concretizar esse ensaio calculou-se a média quadrática entre os grupos de resultados e a média quadrática dentro de cada grupo de resultados, sendo calculada a relação entre a maior e a menor média quadrática (F calculado) que neste caso é 1,55. Como o valor crítico de $F_{2,16}$ para 95 % de confiança é 3,63, pode-se concluir que os resultados dos sinais gerados nas leituras dos brancos são equivalentes e, conclui-se que o método é seletivo.^{131,135}

4.2.1.2.2 Faixa de trabalho e linearidade

Para a realização dos demais ensaios foram analisadas soluções padrão aquoso gerando a curva de calibração demonstrada na Figura 14.

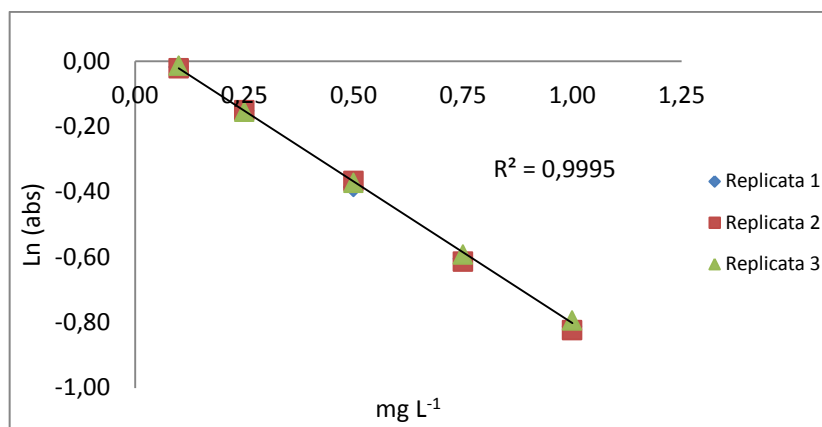


FIGURA 14 - Curva de calibração referente ao método de determinação de iodo (iodeto) nas amostras de xaropes por espectrofotometria UV-VIS com reação de Sandell-Kolthoff

Pelo modelo matemático gerado a sensibilidade (coeficiente angular) do método foi -0,8669, ou seja, uma sensibilidade adequada no que se refere em medidas de absorbância e negativo, uma vez que o aumento da concentração de iodeto (iodo) gera uma diminuição do absorbância pelo consumo do cério (IV).

A linearidade da curva de calibração também foi avaliada através do teste ANOVA da regressão, gerando um F calculado (relação entre a média quadrática da regressão e do resíduo) de 13129,55, enquanto o valor crítico de $F_{1,13}$ para 95 % de confiabilidade é 4,67. Pode-se concluir que o modelo tem superioridade da regressão em relação aos resíduos, estando então ajustado e com boa linearidade.^{127,133}

Os resíduos, ou seja, desvios dos modelos da calibração foram aleatórios nas três replicatas mostrando adequação dos resíduos e estando apresentados na Figura 15.¹³¹

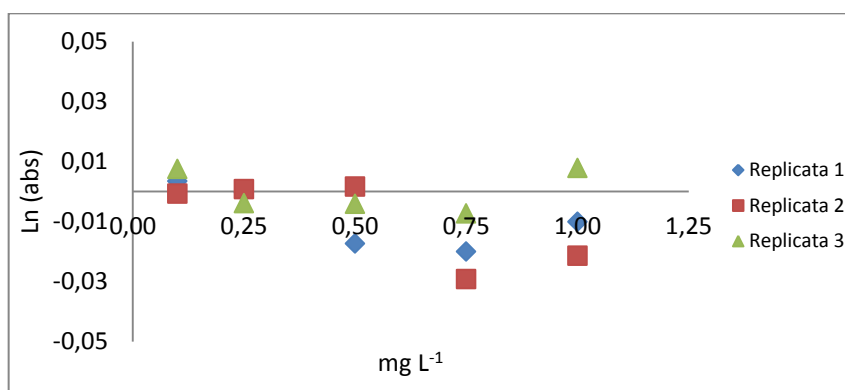


FIGURA 15 - Gráfico de resíduos da calibração do método espectrofotométrico

Também se avaliou o modelo através do teste de Cochran, que consiste na relação entre a maior variância gerada nas análises em cada nível da calibração e o somatório das variâncias em todos os níveis. O valor calculado foi 0,553, já o valor crítico de $C_{3,5}$ para 95 % de confiança é 0,684, portanto pode-se confirmar que as variâncias geradas pelas replicatas em todo intervalo de concentração da curva de calibração são semelhantes, ou seja, o modelo é homocedástico.¹⁴⁸

4.2.1.2.3 Exatidão e precisão

Outro teste de característica de desempenho realizado foi com relação à análise de soluções padrão em meio ao branco da amostra em três concentrações: 0,30; 0,60; 0,90 mg L⁻¹ de iodo. Para verificar a exatidão calculou-se a recuperação média em relação aos resultados esperados nos três níveis de concentração, alcançando os respectivos valores de percentagem de 97,2 % (nível baixo), 98,2 % (nível médio) e 96,3 % (nível alto).

Nos mesmos ensaios avaliou-se a repetitividade através do cálculo dos CVs para os três níveis de concentração trabalhados 3,8 para (nível baixo), 3,2 (nível médio) e 4,3 (nível alto).

Como os valores de recuperação foram altos e os de CVs foram baixos pode-se concluir que o método possui boa exatidão e precisão.¹³²

4.2.1.2.4 Robustez

Na avaliação da robustez foi analisada a amostra 1 com a solução de cério sendo preparada com sulfato de cério de duas marcas e grau de pureza diferentes. O F calculado foi 1,51, já o valor crítico de $F_{5,5}$ para 95 % de confiança foi de 5,05, permitindo aplicação do teste T para variâncias equivalentes, gerando um T calculado de 0,09, já o T_8 crítico para 95% de confiabilidade foi 1,86, mostrando similaridade entre as médias dos resultados nos dois casos.¹³⁶

4.2.1.2.5 Análise das amostras comerciais

Na Tabela 22 é apresentado os resultados das análises das amostras.

TABELA 22 - Resultado da análise das amostras de xaropes comerciais utilizando o método espectrofotométrico UV-VIS

Identificação	Média*	Desv. pad. ^o
Amostra 1	99,2	3,2
Amostra 2	92,9	2,2
Amostra 3	96,5	3,0
Amostra 4	99,6	2,4

*valores em mg de iodeto de potássio a 5 mL do produto

^oDesvio padrão amostral

Os resultados das amostras mostram adequação com o resultado esperado de 100 mg de iodeto de potássio/ 5 mL do xarope.

4.2.2 Determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES

Assim como nas análises dos extratos dos premixes utilizou-se um tempo de aspiração da amostra/solução padrão de 45 s e um tempo de lavagem entre as medidas de 70 s, pois se objetivou a chegada de bastante solução padrão/solução da amostra, sendo por outro lado preciso uma grande quantidade de solução de lavagem para evitar efeito de memória.

Na avaliação das linhas efetuou-se análise da amostra diluída, do branco da amostra e da solução padrão e percebeu-se que as linhas 182,976 e 206,163 nm geraram um aumento da intensidade proporcional a concentração do analito, porém como a linha 182,976 nm apresentou interferência espectral de sobreposição parcial de linhas, optou-se pela seleção da linha 206,163 nm. Para confirmar a possibilidade da utilização desta linha também se observou que o sinal gerado pelo branco da amostra era similar ao sinal gerado na análise do branco de calibração (água) e que a intensidade gerada pela análise da amostra foi similar à observada pela solução padrão, indicando a possibilidade da realização das análises nas condições selecionadas. Com esse ensaio houve a confirmação de que as condições utilizadas

são favoráveis à determinação de iodeto nos xarope por ICP OES, seguindo então para os testes de avaliação da qualidade do método.

A faixa da curva de calibração utilizada nas análises das soluções expectorantes por ICP OES foi 2,29-11,47 mg L⁻¹, pois são concentrações próximas as usadas nos premixes e porque era um intervalo que poderia ser usado na curva de adição de analito com facilidade, devido a concentração da amostra.

4.2.2.1 Avaliação da qualidade do método determinação de iodo em amostras de xaropes usando ICP OES

Para avaliar a qualidade do método realizou-se os testes dos parâmetros de validação descritos abaixo.

4.2.2.1.1 Seletividade

Como primeiro passo dos testes de características de desempenho foi avaliada a seletividade através das análises dos brancos de calibração, branco das amostras com sacarose e branco das amostras com sorbitol, sendo avaliada a equivalência entre os resultados através do teste ANOVA. O valor calculado refere-se a relação da maior soma quadrática calculada (em cada grupo e entre os grupos). E neste caso foi 0,95. O valor de $F_{2,16}$ crítico para 95 % de confiança é 3,63, podendo-se considerar os resultados similares, logo foi possível analisar apenas um branco para descontar nas medidas das amostras.^{130,135}

Também foi avaliado o efeito de matriz (seletividade) por meio da aplicação do o Teste F entre os sinais gerados nas curvas de calibração externa e com adição de analito, obtendo os resultados apresentados na Tabela 23. O F calculado é o a relação entre a maior e menor variância em cada nível de concentração de calibração.¹³¹

TABELA 23 - Teste F para seleção da curva de calibração do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES

Concentração (mg L ⁻¹)	F Calculado para o padrão iodeto
2,29	12,21
4,59	6,96
6,88	3,54
9,17	1,16
11,47	4,20

Como os valores apresentados na Tabela 23 (1,16-12,21) são inferiores ao $F_{2,2}$ para 5 % de confiança que foi 19,00, pode-se perceber similaridade entre as medidas da curva de calibração externa e de adição de analito em todos os níveis de calibração e pela facilidade optou-se pela utilização da curva apenas com as soluções padrão.

4.2.2.1.2 Linearidade

A Figura 16 apresenta a curva de calibração externa média e a curva com adição de analito média, para análise das soluções expectorantes por ICP OES.

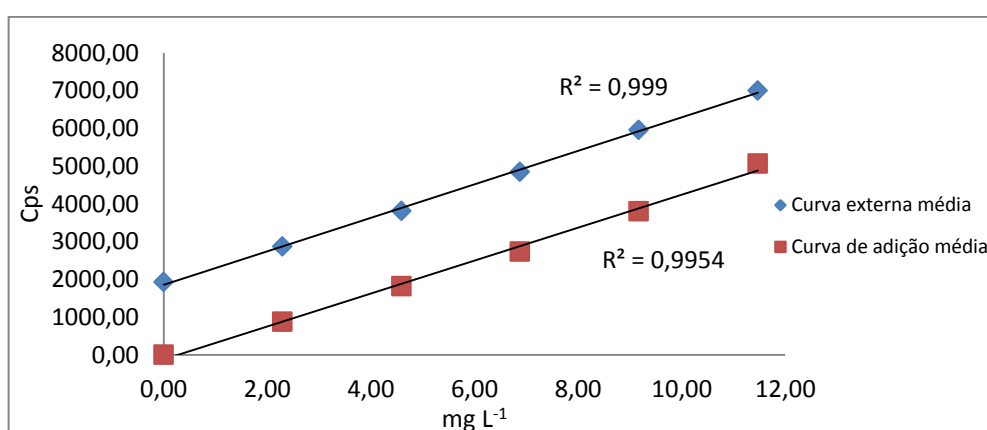


FIGURA 16 - Curvas de calibração externas para o método de ICP OES para análise de medicamento

Como apresentado na figura 16, a curva de calibração externa média gerou R^2 de 0,9989, já a curva de calibração com adição de analito média gerou R^2 de

0,9990. Percebe-se que ambos os R^2 são acima de 0,99, ou seja, valores altos e próximos de 1,0000. Pode-se então concluir que os modelos gerados possuem superioridade da média quadrática total em relação a média quadrática dos resíduos, apresentando então boa linearidade.¹²⁷

As demais avaliações e ensaios abaixo referem-se às curvas de calibração externa.

A sensibilidade do método foi calculada através do coeficiente angular, tendo o valor de 437,53 que é inferior à sensibilidade dos métodos de determinação de metais no ICP OES visto que o sinal gerado para halogênios é inferior devido a menor eficiência na excitação atômica.¹²⁹

Outro teste estatístico aplicado para avaliar a linearidade da curva de calibração externa foi a ANOVA, obtendo um F calculado (relação entre a média quadrática da regressão e dos resíduos) de 6771,05, já o valor crítico de $F_{1,16}$ para 95% de confiança é 4,49, portanto prova-se a diferenciação entre os sinais gerados nos diferentes níveis de concentração na curva de calibração. Também pode-se confirmar superioridade da regressão em relação aos resíduos dos modelos e uma excelente linearidade.^{127,129}

Outra ponderação em relação aos resultados da curva de calibração foi obtivo por meio da confecção do gráfico dos resíduos, como demonstrado na Figura 17.

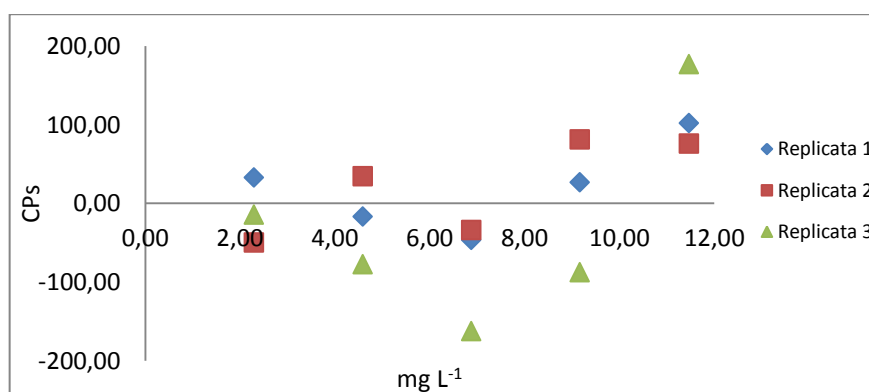


FIGURA 17 - Resíduos da curva de calibração do método de ICP OES para análise de medicamentos

Observa-se na Figura 17 que os pares ordenados geraram pontos com valores aleatórios, ou seja, não possuem uma tendência e, por conseguinte afirma-se a adequação do modelo.¹³¹

Para analisar a homogeneidade dos resultados da curva de calibração foi aplicado o teste de Cochran, tendo um valor calculado de 0,370, já o $C_{3,5}$ crítico com 95 % de confiança foi 0,684, ou seja, pode-se considerar o modelo como homocedástico, ou seja, com homogeneidade nas variâncias em todo os níveis de concentração da curva de calibração. Portanto está correto o cálculo da equação da calibração através do método dos mínimos quadrados.¹²⁷

4.2.2.1.3 Efeito de memória

Em determinações de iodo por ICP OES é comum ocorrer efeito de memória devido a adsorção/absorção em diversos materiais, logo foram analisadas alternadamente brancos e solução padrão, gerando baixos desvio nas medidas tanto para solução padrão quanto do branco. Notou-se que as intensidades dos padrões não aumentam e nem diminuem continuamente, e que os valores de branco se mantiveram baixos mesmo após a aspiração da solução padrão verificando que não houve uma tendência, ou seja, efeito de memória.⁶

4.2.2.1.4 Robustez

Objetivando avaliar as condições utilizadas nas análises dos medicamentos realizou-se as medidas do magnésio do teste de robustez em ICP OES, gerando uma relação média (intensidade na linha iônica/intensidade na linha atômica) de $9,16 \pm 0,07$, demonstrando boa estabilidade do plasma.¹³⁸

Também foi avaliada a robustez com relação ao pH na amostra. Vale ressaltar que as amostras por estarem diluídas em meio aquoso apresentaram pH próximo a 7,00. Foram ajustados o pH das soluções diluídas para 5,50 e para 8,00 gerando os sinais apresentados na Tabela 24.

TABELA 24 - Resultados do ensaio de robustez do método de determinação de iodo em amostras de xaropes por ICP OES – estudo do pH

	pH 5,50	pH 7,00	pH 8,00
Média	1584,30	1907,80	1999,08
Desv. Pad.*	83,17	84,48	57,67

*Desvio padrão amostral

Resultados em cps (unidade de intensidade)

Através dos dados contidos na tabela acima percebe-se que as medidas com pH 5,50 foram bastante diferentes das com pH 7,00 e 8,00, logo observa-se que o método não é robusto para tal condição.¹³⁶

4.2.2.1.5 Exatidão e precisão

Com a finalidade de avaliar a exatidão e a precisão (repetitividade) foi realizada análise de soluções padrão em meio ao xarope base em três concentrações: 4,00; 7,00 e 10,00 mg L⁻¹ de iodo. Para verificar a exatidão calculou-se a recuperação média em relação aos resultados esperados, alcançando os respectivos valores de 103,9 % (nível baixo), 101,1 % (nível médio) e 101,0 % (nível alto).

Nos mesmos ensaios calculou-se os CVs, obtendo para os três níveis de concentração trabalhados valores de 3,1 para (nível baixo), 2,3 (nível médio) e 5,8 (nível alto).

Considerando a dificuldade que se tem na determinação de iodo e que os valores de recuperações foram altos e os de CVs foram relativamente baixos pode-se concluir que o método é adequado.

4.2.2.1.6 Análise das amostras comerciais

Como o método apresentou boa qualidade analítica foram analisadas quatro amostras comerciais e os resultados estão apresentados na Tabela 25.

TABELA 25 - Resultado das análises das amostras de xaropes comerciais utilizando o método por ICP OES

Identificação	Média*	Desv. pad. ^o
Amostra 1	97,8	4,3
Amostra 2	93,3	3,4
Amostra 3	97,2	3,6
Amostra 4	94,2	4,0

^o Desvio padrão amostral

*valores em mg de iodeto de potássio a 5 mL do produto

As análises dos medicamentos mostram na maioria dos casos resultados similaridade com o resultado esperado de 100 mg de iodeto de potássio em 5 mL do xarope. A concentração que se desviou consideravelmente do valor previsto deve-se a problemas da amostra e a desvio experimentais.

4.3 Comparação dos métodos

Foi avaliada a qualidade analítica dos dois métodos de determinação de iodo nas soluções expectorantes, ambos através o preparo das amostras por diluição em solução aquosa.

O método espectrofotométrico com tempo fixo é de baixo custo, rápido e moderada complexidade de execução, porém deve-se ter bastante atenção ao verificar a absorbância no tempo correto para minimização dos erros. Quanto ao método por ICP OES pode-se concluir que requer maior custo devido ao equipamento e os gases utilizados, mas também é de rápida execução, gerando excelentes figuras de mérito principalmente sensibilidade, mas deve-se estar alerta aos cuidados a serem tomados para evitar o efeito de memória.

Os métodos também possuem diferenças principalmente em relação a faixa de trabalho, sendo em ICP OES (2,29 - 11,47 mg L⁻¹ de iodo) e no espectrofotométrico (0,10 - 1,00 mg L⁻¹ de iodo), logo para realização da análise pelo método espectrofotométrico foi necessária uma maior diluição da amostra levando a maiores desvio do resultado.

O método por ICP OES possui sensibilidade de 437,53 que é muito superior a do método de Sandell-Kolthoff que é -0,8669, havendo mais fácil identificação de menores variações na concentração, gerando então resultados mais exatos e menos precisos. Isso pode ser observado pelos resultados do teste de exatidão e precisão (repetitividade) que gerou recuperação (96,3 - 98,2 %) e CVs (3,2 - 4,3) para o método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff e recuperação (101,0 - 104,0 %) e CVs (2,3 - 5,8) para o método por ICP OES.

Os resultados das análises das amostras mostraram que os métodos geram respostas similares, assim como apresentado na Tabela 26.

TABELA 26 - Comparação dos resultados das amostras de xaropes alcançado pelo método espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff e ICP OES

Espectrofotométrico de Sandell-Kolthoff			ICP OES	
Identificação	Média*	Desv. pad. ^o	Média*	Desv. pad. ^o
Amostra 1	99,2	3,2	97,8	4,3
Amostra 2	92,9	2,2	93,3	3,4
Amostra 3	96,5	3,0	97,2	3,6
Amostra 4	99,6	2,4	94,2	4,0

^o Desvio padrão amostral

*valores em mg de iodeto de potássio a 5 mL do produto

Outro ponto de destaque é que os equipamentos utilizados nesse estudo servem para diversos outros ensaios na área farmacêutica, cabendo aos analistas avaliarem os resultados dos ensaios de qualidade, o custo financeiro e a aplicabilidade do método a fim de selecionarem o melhor em cada situação.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Dentre os testes de preparo das amostras de premixes encontrou-se melhor eficiência em temperatura ambiente e com uso da solução citrato de sódio que é levemente alcalina. Essas condições diminuíram a possibilidade de perdas do analito por volatilização, sendo as indicadas.

Acredita-se que o uso do citrato de sódio no preparo dos premixes facilitou a solubilização do iodo, uma vez que pode ter ocorrido complexação de íons que dificultavam a disponibilidade/solubilização do analito.

As soluções expectorantes por serem de composição menos complexa foram preparadas por diluição em meio aquoso, tanto para análise espectrofotométrica de Sandell-Kolthoff quanto para análise por ICP OES.

Cuidados como realização das análises logo após o preparo das soluções e o transporte das soluções/extratos em tubos falcon® envolvidos com papel alumínio ajudaram a minimizar perdas dos analitos.

Na aplicação do método de Sandell-Kolthoff por tempo fixo possibilitou maior agilidade em relação à maioria dos métodos de Sandell-Kolthoff utilizados, porém vale destacar que essa mudança acarretou em alterações na faixa analítica do método não sendo vantajoso em determinações de iodo em níveis traços, mas sendo adequada para as concentrações das amostras deste estudo. Os ensaios realizados com este método mostraram que ele é viável para determinação de iodo em xaropes, porém nos premixes analisados verificou-se interferência na reação de oxirredução que rege o método, impedindo a concretização da análise.

Os métodos desenvolvidos por ICP OES tanto para análise das amostras de premixes quanto para análise das amostras de xaropes se utilizaram de condições operacionais otimizadas, de forma a favorecer significativamente a sensibilidade dos métodos.

A análise das amostras de xarope pelo método espectrofotométrico com reação Sandell-Kolthoff e por ICP OES geraram resultados semelhantes, mostrando equivalência entre os métodos desenvolvidos. Portanto, a seleção do método está pautada principalmente de acordo com a disponibilidade dos equipamentos, materiais e reagentes envolvidos em cada procedimento.

Os métodos aplicados nesse estudo tiveram a qualidade afirmada através das análises de alguns parâmetros de validação e em comparação a outros métodos usados para determinação de iodo têm-se como vantagens as etapas de preparação de amostra, pois não são usados reagentes tóxicos e se utilizam equipamentos de baixo custo. Outra vantagem refere-se às operações de quantificação, pois requerem equipamentos que são facilmente encontrados em laboratórios de análise.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

1. A importância do iodo. Disponível em: <http://www.ribeiraocontraocancer.com.br/paginas.cfm?id=251&p=o-iodo-da-alimentacao-e-o-cancer-de-tireoide>. Acessado em 20 de janeiro de 2014.
2. LANA, R. de P. *Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades)*. Viçosa: UFV, 2005, 111, 112 p.
3. Xarope de iodeto. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/bula/6599/iodeto_de_potassio.htm. Acessado em 02 de janeiro de 2014.
4. BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 Jan. 1999. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9782.htm. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.
5. BRASIL. Decreto Nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 12 dez. 2007. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6296.htm. Acessado em 06 de março de 2014.
6. de OLIVEIRA, A. A. **Determinação de iodo por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial**. Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009. 3, 27-30, 38-40 p.
7. VIEIRA, F. I. **Aplicação dos métodos volumétricos de precipitação e de óxi-redução na quantificação de iodo, iodeto de potássio e cloreto de potássio em**

medicamentos. Monografia de graduação. Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. 22, 23, 27, 28 p.

8. MARY, G.; BALASUBRAMANIAN, N.; NAGARAJA, K. S. Spectrophotometric determination of iodine species in table salt and pharmaceutical preparations. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 888, 889, 2008.

9. WOLLARD, D. C.; INDYK, H. E. Determination of iodide in high-dose dairy ingredient premixes by high performance liquid chromatography. *Int. Dairy J.*, **34**, 62-64, 2014.

10. MESKO, F. M.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 1125-1131, 2010.

11. MULLER, A. L. H.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, **27**, 1889, 2012.

12. TAFLICK, T.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. L. M.; ANTES, F. G.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Determination of bromine, fluorine and iodine in mineral supplements using pyrohydrolysis for sample preparation. *J. Braz. Chem. Soc.*, **23**, 488-489, 2012.

13. Determinações iodométricas. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/2001/02/18/determinacoes-iodometricas/>. Acessado em 20 de janeiro de 2013.

14. CHOENGCHAN, N.; LUKKANAKUL, K.; RATANAWIMARNWONG, N.; WAIYAWAT, W.; WILAIRAT, P.; NACAPRICHA, D. Use of pseudo-first order kinetics in flow injection for determination of trace inorganic iodine. *Anal. Chim. Acta.*, **499**, 115, 116, 2003.

15. NORMAN, B. R.; IYENGAR, G. V. Determination of iodine in diverse botanical and dietary matrices by pre-irradiation combustion followed by neutron activation analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348**, 430, 1994.
16. SULLIVAN, D.; ZYWICKI, R. Determination of total iodine in foods and Dietary supplements using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **95**, 195-202, 2012.
17. HE, Q.; FEI J; HU, S. Voltammetric method based on an ion-pairing reaction for the determination of trace amount of iodide at carbon-paste electrodes. *Anal. Sci.*, **19**, 681, 2003.
18. MILAKOVIC, M.; BERG, G.; EGGERTSEN, R.; NYSTROM, E.; OLSSON, A.; LARSSON, A.; HANSSON, M. Determination of intrathyroidal iodine by x-ray fluorescence analysis in 60-to 65-year olds living in an iodine-sufficient area. *J. Intern. Med.*, **260**, 69, 2006.
19. JOOSTER, P. L.; BTECH, E. S. Methods for determination of iodine in urine and salt. *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.*, **24**, 79-80, 2010.
20. AUMONT, G.; TRESSOL, J. C. Rapid method for the direct determination of Inorganic Iodine in plasma using Ion-exchange chromatography and the Sandell and Kolthoff reaction. *Analyst*, **112**, 875-878, 1987.
21. MAHESH, D. L.; DEOSTHALE, Y. G.; NARASINGA, R. Sensitive kinetic assay for the determination of iodine in foodstuffs. *Food Chem.*, **43**, 51-52, 1992.
22. MONTASER, A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, New York: Wiley, 1998. 104, 108-110 p.
23. NAOZUKA, J.; da VEIGA, M. A. M. S. V.; OLIVEIRA, P. V.; de OLIVEIRA, E. Determination of chlorine, bromine and iodine in milk samples by ICP-OES. *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 917-921, 2003.

24. Orientações sobre validação de métodos analíticos. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acessado em 15 dezembro de 2013.
25. Iodine in environment. Disponível em: <http://www.spring8.or.jp/pdf/en/resfro/11/14-115.pdf>. Acessado em 14 de maio de 2014.
26. COSTA, R. O; CARVALHAL, A. Uso do iodeto de potássio na Dermatologia: considerações atuais de uma droga antiga. *An. Bras. Dermatol.*, **88**, 401-406, 2013.
27. Polivinilpirrolidona iodada. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudo/conteudo/2805/iodopovidona.htm>. Acessado em 08 de março de 2014.
28. Tintura de iodo. Disponível em: <http://mercado.ruralcentro.com.br/oferta/51648/tintura-de-iodo-10-pinus#y=4>. Acessado em 08 de março de 2014.
29. MIGLIANO, M. F.; STOPIGLIA, A. V. Actinomicose na mandíbula de um cão. *Rev. Fac. Med. Vet.*, **4**, 163, 1949.
30. Iodine speciation in foods. Disponível em: http://iae.canberra.edu.au/html/projects/HonoursProjects2012_2.pdf. Acessado em 30 de julho de 2014.
31. BŁAŻEWICZ, A. A review of spectrophotometric and chromatographic methods and sample preparation procedures for determination of iodine in miscellaneous matrices. *Macro Nano spectrosc.*, **18**, 375-378, 2012.
32. Speciation iodine in foods. Disponível em: <http://emaxilab.com/saude-e-bem-estar-artigo-1-2719.html>. Acessado em 05 de maio de 2014.
33. Iodo no sal de cozinha. Disponível em: <http://nutricao.saude.gov.br/iodo.php>. Acessado em 10 de novembro de 2012.

34. DONATTI, F. C. **Teor de iodo em rações e sua relação com o hipotireoidismo em cães no Brasil**. Tese de doutorado. Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012. 40-44, 59 p.
35. Iodo na alimentação animal. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/iodo.pdf>. Acessado em 10 de junho de 2014.
36. Premixes com iodo. Disponível em: <http://www.farm.com.br/animais/artigos.asp?portal=suinos&artigo=1586>. Acessado em 05 de junho de 2014.
37. Suplementos com iodo. Disponível em: <http://tratarsaude.blogspot.com.br/2014/04/beneficios-da-suplementacao-deiodona.html>. Acessado em 30 de maio de 2014.
38. Iodeto de potássio 10%. Disponível em: <http://www.laboratorioprado.com.br/produto/injetaveis/iodeto-iodo-papeira-bocio-bovino-prado>. Acessado em 06 de março de 2014.
39. Xarope de iodo. Disponível em: <http://www.bulas.med.br/bula/6999/xarope+de+iodeto+de+potassio+enila.htm>. Acessado em 09 de março de 2014.
40. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 860-862 p.
41. Iodo no sal de cozinha. Disponível em: <http://nutricao.saude.gov.br/iodo.php>. Acessado em 10 de Novembro de 2012.
42. GANONG, W. F. Fisiologia médica. São Paulo: Atheneu, 1983. 263-265, 271, 272 p.
43. ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; de SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. B. Nutrição animal – As bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos. São Paulo: Nobel, 1999. 240, 242, 243 p.

44. FLACHOWSKY, G. Iodine in animal nutrition and Iodine transfer from feed into food of animal origin. *lohmman-informatio.*, **42**, 47-50, 2007.
45. Iodine in European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – EMEA. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/documentlibrary/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014479.pdf. Acessado em 20 de Agosto de 2013.
46. RIET-CORREA, F.; SOARES, M. P.; MENDEZ, M. C. Intoxicação em equinos no Brasil. *Ciência rural*, **28**, 720, 1998.
47. Excesso de iodo. Disponível em: http://www.nutricaoempauta.com.br/lista_artigo.php?cod=472. Acessado em 20 de Fevereiro de 2014.
48. Excesso de iodo. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/18191>. Acessado em 20 de Fevereiro 2014.
49. BROWN, C.F.; GEISZLER, K. N.; VICKEMAN, TANYA S. Extraction and quantitative analysis of iodine in solid and solution matrixes. *Anal. Chem.*, **77**, 7064, 2005.
50. NIEDOBOVA, E.; MACHÁT, J.; OTRUBA, V.; KANICKÝ, V. Vapour generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry in determination of total iodine in milk. *J. Anal. At. Spectrom.*, **20**, 946-949, 2005.
51. GAMALLO-LORENZO, D.; del BARCIELA-ALONSO, M.; MOREDA-PIÑEIRO, A. M.; BARRERA-BERMEJO, A.; BARRERA-BERMEJO, P. Microwave-assisted alkaline digestion combined with microwave-assisted distillation for the determination of iodide and total iodine in edible seaweed by catalytic spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, **542**, 287-295, 2005.
52. HOEHNE, L. **Avaliação de métodos de preparo de amostra para a determinação de halogênios em alumina de alta pureza.** Tese de doutorado.

Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.16 p.

53. KRUG, F.J. Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Ed. Piracicaba, 2010, 79, 156, 194, 259, 279, 280 p.

54. DATE, A. R.; STUART, M. E. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry to the simultaneous determination of chlorine, bromine and iodine in the national bureau of standards reference material 1648 urban particulate. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 654, 655, 659, 660, 1988.

55. BEJEY, A.M.; ALAMIN, M. B.; MIZERA, J.; KUCERA, J. Determination of iodine in foodstuffs consumed in Libya using instrumental and radiochemical neutron activation analysis. *Czech. J. Phys.*, **56**, 159-163, 2006.

56. ANDRASI, E.; KUCERA, J.; BELAVARI, C.; MIZERA, J. Determination of iodine in human brain by epithermal and radiochemical neutron activation analysis. *Microchem. J.*, **85**, 157-163, 2007.

57. KUCERA, J.; IYENGAR, G. V.; RANDA, Z.; PARR, R. M.; Determination of iodine in Asian diets by epithermal and radiochemical neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **259**, 505-509, 2004.

58. WIFLADT, A.; LUND, W. Determination of iodine in seaweed and table salt by an indirect atomic-absorption method. *Talanta*, **36**, 395-399, 1989.

59. AUMONT, G.; TRESSOL, J. C.; Improved routine method for the determination of total iodine in urine and milk. *Analyst.*, **111**, 875-877, 1986.

60. YEBRA, M. C.; BOLLAIN, M. H. A simple indirect automatic method to determine total iodine in milk products by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **82**, 828-833, 2010.

61. FIEDLEROVA, V., Spectrophotometric determination of iodine and its content and stability in selected food raw materials and products. *Czech J. Food Sci.*, **16**, 163-167, 1998.
62. LAUBER, K. Iodine determination in biological material. Kinetic measurement of the catalytic activity of iodide. *Anal. Chem.*, **47**, 769-71, 1975.
63. WHITEHEAD, D; THOMAS, J. E. Use of a nebulizer in pyrohydrolytic decomposition of silicate materials for determination of fluorine and chlorine. *Anal. Chem.*, **57**, 2421-2423, 1985.
64. ANTES, F.G. **Decomposição de coque, resíduo de vácuo e petróleo extrapesado por piroidrólise para determinação de cloro.** Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
65. WARF, A.C; CLINE, W. D.; TEVEBAUGH, R. D. Pyrohydrolysis in the determination of fluoride and other halides. *Anal. Chem.*, **26**, 342-346, 1954.
66. FARZANEH, A; TROLL, G. Pyrohydrolysis for the rapid determination of chlorine traces in silicate and non-silicate minerals and rocks. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **292**, 293-295, 1978.
67. LAUNGENAUER, M.; KRAHENBULHL, U. Determination of fluorine and iodine in biological materials. *Anal. Chim. Acta*, **274**, 253-256, 1993.
68. LAUNGENAUER, M.; KRAHENBULHL, U; FURRER, V; WYTTEBACH, A. Determination of fluorine, chlorine, bromine and iodine in seven geochemical reference samples. *Geos. new.*, **16**, 41-44, 1992.
69. Preparo de amostra. Disponível em: http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/07/Aula-9-Preparo-de-amostras-2a-parte_2S-2011-Modo-de-Compatibilidade.pdf. Acessado em 10 de março de 2014.

70. HEDAYATI, M.; ORDOOKHANI, A.; DANESHPOUR, M. S.; AZIZI, F. Rapid acid digestion and simple microplate method for milk iodine determination. *J. Clin. Lab. Anal.*, **21**, 286–292, 2007.
71. FISCHER, P. W.; L'ABBÉ M. R. Acid digestion determination of iodine in foods. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **64**, 71-74, 1981.
72. FRIEDMAN, H. S. Observations on the determination of serum protein-bound iodine. *Clin. Chim. Acta*, **7**, 111-113, 1962.
73. GOMEZ-GUZMAN, J. M.; ENAMORADO-BAEZ, S. M.; PINTO-GOMES, A. R.; ABRIL-HERMANDEZ, J. M. Microwave based digestion method for extraction of I^{-127} and I^{-129} from solid material for measurements by AMS and ICP-MS. *Inter. J. Mass. Spec.*, **303**, 103-108, 2011.
74. TIRAN, B.; WAWSCHINEK, O.; EBER, O.; BEHAM, A.; LAX, S.; DERMELJ, M. Simple determination of iodine in small specimens of thyroid-tissue. *Exp. Clin. Endo.*, **98**, 32-36, 1991.
75. KRENGEL-ROTHENSEE, K.; RICHTER, U; HEITLAND, P. Low-level determination of nonmetals (Cl, Br, I, S, P) in waste oils by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using prominent spectral lines in the 130–190 nm range. *J. Anal. Atm. Spectrom.*, **14**, 699–702, 1999.
76. PATZELTOVÁ, N. Determination of microquantities of iodine in biological materials. *Chem. Papers*, **47**, 237-239, 1993.
77. MAY, S. L.; MAY, W. A.; BOURDOUX, P. P.; PINO, S; SULLIVAN, K. M.; MABERLV, G. F. Validation of a simple, manual urinary iodine method for estimating the prevalence of iodine-deficiency disorders, and interlaboratory comparison with other. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 1441-1445, 1997.

78. ECKHOFF, K. M.; MAAGE, A.. Iodine Content in Fish and Other Food Products from East Africa Analyzed by ICP-MS. *J. Food Comp. Anal.*, **10**, 270–282, 1997.
79. DUNN, J.; CRUTCHFIELD, R.; GUTEKUNST, R.; DUNN, A. D. Two simple methods for measuring iodine in urine. *Thyroid*, **3**, 119-23, 1993.
80. MURILLO, M.; CARRIÓN, N.; QUINTANA, M.; SANABRIA, G.; RÍOS, G., DUARTE, L.; ABLAN, F. Determination of selenium and iodine in human thyroids. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **19**, 23–27, 2005.
81. PICOLOTO, R. S. **Determinação em elementos traço em solo por ICP-MS após volatilização empregando combustão iniciada por micro-ondas.** Dissertação de mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011. 26-29, 42 p.
82. MESKO, M. F.; PEREIRA, J. S. F.; MORAES, D. P.; KNORR, C. L.; BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; PANIZ, J. N. G.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M.; Combustão iniciada por micro-ondas com radiação focalizada: um novo método para decomposição de amostras. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, águas de Lindóia. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T1391-1.pdf>. Acessado em 03 de março de 2014.
83. ANDREY, D.; ZBINDEN, P.; KWOK, M.; LEE, W. A routine quality control method for the determination of iodine in human and pet food by ICP-MS. *Atomic spectrosc.*, **22**, 299-305, 2001.
84. GELINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. Determination of total iodine in nutritional and biological samples by ICP-MS following their combustion within an oxygen stream. *Anal. Chem.*, **70**, 1021-1025, 1998.
85. FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; KNAPP, G. Determination of halogens in coal after digestion

using the macrowave-induced combustion technique. *Anal. Chem.*, **80**, 1865-1870, 2008.

86. MESKO, M. F. **Determinação de halogênios em carvão, coque petroquímicos e alimentos após combustão iniciada por microondas.** Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008. 47-56 p.

87. HARTWIG, C. de A.; CRIZEL, M. G.; TORRALIZ, I. G.; COSTA, V. C.; MÜLLER, A. H.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Determinação de iodo em algas comestíveis após diferentes procedimentos de preparo das amostras. In: XIII encontro depós graduação da UFPEL, Pelotas, 2011. Anais eletrônicos. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/enpos/2011/anais/pdf/CE/CE_00348.pdf. Acessado em 20 de setembro de 2012.

88. HARTWIG, C. de A.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, L. A.; COSTA, V. C.; MÜLLER, A. H.; MESKO, M. F. In: XIII encontro depós graduação da UFPEL, Pelotas, 2011. Anais eletrônicos. Disponível em: http://www2.ufpel.edu.br/enpos/2011/anais/pdf/CE/CE_00348.pdf. Acessado em 20 de setembro de 2012.

89. CRUZ, S. M.; SCHMIDT, L.; DIEHL, L. O.; ABAIDE, E. R.; ALMEIDA, M. T.; RODRIGUES, C. B.; FLORES, E. M. M. Determinação de halogênios por cromatografia de Íons em grafite de alta pureza após combustão iniciada por radiação micro-ondas. In: 36ª reunião anual da sociedade brasileira de química, 2013. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://www.eventoexpress.com.br/cd-36rasbq/resumos/T0640-1.pdf>. Acessado em 10 de março de 2014.

90. ABOUHIAT, F. Z.; HENRÍQUEZ, C.; HORSTKOTTE, B.; YOUSFI, F.; CERDA, V. A miniaturized analyzer for the catalytic determination of iodide in seawater and pharmaceutical samples. *Talanta*, **108**, 93, 2013.

91. YU, Y.; DOU, S.; CHEN, M.; WANG, J. Iodine excitation in a dielectric barrier discharge microplasma and its determination by optical emission Spectrometry. *Analyst*, **138**, 1719, 2013.
92. NAKAHARA, T.; MORI, T. Analyte volatilization procedure for the determination of low concentrations of iodine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. Atm. Spectrom.*, **9**, 159-165, 1994.
93. FECHER, P. A.; GOLDMANN, I.; NAGENGAST, A. Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 977-982, 1998.
94. ALLAIN, P.; MAURAS, Y.; DOUGE, C.; JAUNAUULT, L.; DELAPORTE, T.; BEAUGRAND, C. Determination of iodine and bromine in plasma and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst.*, **115**, 1990, 813.
95. HOFFMAN, W. M.; BREEN, H. J. Phosphate rock solubilization by repeated extractions with citrate solutions. *Phosp. Rock Clas.*, **12**, 344-346, 1964.
96. UCHIDA, T.; ISOYAMA, H.; YAMADA, K.; OGUCHI, K.; NAKAGAWA, G. determination of twelve elements in botanical samples with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after leaching with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal. Chim. Acta*, **256**, 277-284, 1992.
97. PINO, S.; FANG, S.; BRAVERMAN, L. E. Ammonium persulfate: a safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clin. Chem.*, **42**, 239-243, 1996.
98. OHLWEILER, O. A. Química analítica quantitativa 2. 2ª Ed. Rio Grande do sul: Livros técnicos e científicos, 1976. 581-585 p.
99. VILLELA, G. G.; PECCI, J. D. Nota sobre a dosagem iodométrica da vitamina C nos frutos cítricos. *Memória do instituto Oswaldo Cruz*, **39**, 293-295, 1943.

100. ROLIM, L; PINHEIRO, T. C.; FERNANDES, A. P. S. Determinação do teor de iodo no sal para consumo humano na cidade de zé doca – MA. In: CONNEPI, 2012. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/905/624>. Acessado em 10 de agosto de 2014.
101. LIMA, M. A.; TEIXEIRA, L. N.; de SOUSA, P. B.; de JESUS, M.; da SILVA, M.; CRAVALHO, L. F. M. Quantificação dos Teores de Iodo e Cloreto de Sódio em Sal de Cozinha comercializado em Teresina-PI. In CONNEPI, 2012. Anais eletrônicos. Disponível em: <http://propi.iftto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/4289/3039>. Acessado em 10 de agosto de 2014.
102. CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 187, 188, 193, 194, 195, 199, 200 p.
103. Guide to Inorganic Analysis. Disponível em: http://www.groco.is/groco/upload/Files/anualar_fra_birgjum/pe/icp_7_maio_2008/gde_inorganicanalysis.pdf. Acessado em 02 de Abril de 2013.
104. GUINÉ-ROSIAS, M. F. Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP–AES). 1ª Ed. Piracicaba: CPG/CENA, 1998. 3, 32, 33, 34, 40, 41, 104 p.
105. HOLLER, F. J; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 238, 239, 240, 241, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276 p.
106. BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. 2ª Ed. Perkin Elmer, 1997. 2º cap., 4, 5, 7 p.; 3º cap., 25, 26, 27 p.
107. BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas- a critical review. *Spectrochim. Acta Part B*, **55**, 1196, 1199, 1200p., 2000.

108. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 6ª Ed. São Paulo: Thomson, 2006. 175, 176, 144, 812 p.
109. NIEDOBOVÁ, E.; MACHÁT, J.; KANICKÝ, V.; OTRUBA, V. Determination of iodine in Enriched Chlorella by ICP-OES in the VUV Region. *Microchim. Acta*, **150**, 103–107, 2005.
110. SOUZA, G.B.; CARRILHO, E.N.V.M.; OLIVEIRA, C.V.; NOGUEIRA, A.R.A.; NOBREGA, J.A. Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, **57**, 2195–2201, 2002.
111. AL-AMMAR, A.; REITZNEROVÁ, E.; BARNES, R. M. Thorium and iodine memory effects in inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**, 479–482, 2001.
112. Espectrofotometria UV-VIS. Disponível em: www.c2o.pro.br/automacao/x2083.html. Acessado em 19 de novembro de 2012.
113. DYRKA, A.; RYSZARD, D.; NASKALSKI, J. W.; ZBIGNIEW, S.; FRANEK, E. Assay of iodine in edible salt using Sandell-Kolthoff catalytic method, *Journ. of Lab. Diagnostics*, **47**, 425-429, 2011.
114. SANDELL, E. B.; KOLTHOFF, I. M. Micro determination of iodine by a Catalytic method. *Microchim. Acta*, **9**, 10, 21, 1937.
115. MILHORANSA, P. **Variabilidade da excreção urinária de iodo em indivíduos normais**. Dissertação de mestrado. Departamento de ciências médicas do Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. 22 p.
116. HALDIMANN, M.; WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M. Determination of iodine concentration in salt dual fortified with iron and iodine. *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 96-98, 2003.

117. ESTEVES, R. Z.; KASAMATSU, T. S.; KUNII, I. S.; FURUZAWA, G. K.; VIEIRA, J. G. H.; MACIEL, R. M. B. Desenvolvimento de um método para a determinação da iodúria e sua aplicação na excreção urinária de iodo em escolares brasileiros. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1479, 2007.
118. TROKHIMENKO, O. M.; ZAITSEV, V. N. Kinetic determination of Iodide by the Sandell–Kolthoff reaction using diphenylamine-4-sulfonic acid. *J. Anal. Chem.*, **59**, 491-494, 2004.
119. SHELOR, C. P.; DASGUPTA, P. K. Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Anal. Chem. acta*, **702**, 17, 2011.
120. OHASHI, T.; YAMAKI, M.; PANDAV, C. S.; KARMARKAR, M. G.; IRIE, M. Simple Microplate Method for Determination of Urinary Iodine. *Clinic. Chem.*, **46**, 530, 2000.
121. MOTA, F. D. B. **Aplicação de análises de componentes principais (PCA) e ICP OES para a caracterização de vinhos do Estado do Espírito Santo.** Monografia de conclusão de curso. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011. 11, 30-35 p.
122. dos SANTOS, M. F.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A; BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. *Quím. Nova*, **34**, 1629, 1630, 2011.
123. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova*, **29**, 344-346, 2006.
124. BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª Ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 1-3, 111, 132, 133, 245, 251, 302,401 p.

125. NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais.** Tese de doutorado. Departamento de química da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.11-12 p.
126. FABRINO, H. J. F. **Emprego de otimização multivariada no desenvolvimento de métodos para determinação de metais de interesse em soro e sangue humanos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.** Dissertação de mestrado. Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008. 31-33 p.
127. PIMENTEL, M. F.; de BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Quim. Nova*, **19**, 270, 271, 1996.
128. PEIXOTO, R. G. A.; OLIVEIRA, A.; CADORE, S. Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 8117 8118, 2012.
129. Manual da garantia da qualidade analítica. Disponível em: <http://bibliotecaquimicaufmg2010.files.wordpress.com/2012/02/mapa-2011-manual-de-garantia-da-qualidade-analitica.pdf>. Acesso em 10 de novembro de 2013.
130. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, **27**, 771-775, 2004.
131. RAYA-RODRIGUES, M. T.; ALBANO, F.M. Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais. Porto Alegre: Rede metrológica RS, 2009, 29, 39-41 p.
132. BRASIL. Resolução normativa nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação

animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 Jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12++Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 10 de junho de 2013.

133. BRITO, N. M.; de AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussões. *R. ecotoxicol. e meio ambiente*, **13**, 129-146, 2003.

134. CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; da NOBREGA, A. W.; ABRANTES, S. de M. P. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **30**, 63-72, 2010.

135. Guia de validação e controle de qualidade analítica. Brasília: MAPA, 2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Animal/Laborat%C3%B3rios/RCA/Guia%20de%20valida%C3%A7%C3%A3o%20e%20controle%20de%20qualidade%20analítica.pdf. Acessado em 20 de novembro de 2013.

136. SANTANA, A.K.M.; NUNES, L.C.C.; MEDEIROS, F.P.M.; SILVA, M.J.; LAVRA, Z.M.M.; ROLIM-NETO, P.J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **28**, 177-183, 2007.

137. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Official Methods of Analysis of AOAC International, [S.l]: AOAC, 2002. Disponível em: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf. Acessado em 05 de janeiro de 2014.

138. VIEIRA, E. C. **Avaliação de potencialidades e aplicações de espectrômetros com plasma acoplado indutivamente em análises químicas.**

Tese de doutorado. Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007, 23 p.

139. Conceitos para formulação de ração: ingredientes e nutrientes. Disponível em: <https://www.portaleducacao.com.br/veterinaria/artigos/2510/conceitos-para-formulacao-de-racao-ingredientes-e-nutrientes>. Acessado em 27 de janeiro de 2014.

140. Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Disponível em: http://www.cpafrro.embrapa.br/mediaarquivos/publicacoes/doc_alimentacaoderuminantes.pdf . Acessado em 06 de janeiro de 2014.

141. Alimentação animal. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao>. Acessado em 04 de março de 2014.

142. BRASIL. Instrução normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Aprovar o regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização, constante dos anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 Dez. 2004. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692>. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

143. Tabela de aditivos autorizados para uso em produtos destinados á alimentação de animais de companhia – geral com exceção dos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Alimenta%C3%A7%C3%A3o%20Animal/LISTAGEM%20ADITIVOS%20AUTORIZADOS%20_29_07_2011%20REV.doc. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

144. Tabela de aditivos autorizados para uso em produtos destinados á alimentação de animais de companhia - pet food. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados>. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

145. MOSS, B. R.; MILLER, J. K. Metabolism of sodium iodide, calcium iodate, and pentacalcium orthoperiodate initially placed in the bovine rumen or abomasums. *J. of Dairy Sci.* **53**, 772, 1970.
146. Iodato de cálcio. Disponível em: http://www.indukern.com.br/arquivosUp/86_IODATO_DE_C%C3%81LCIO.pdf. Acessado em 10 de janeiro de 2013.
147. Padronização do tiosulfato de sódio. Disponível em: <http://www.ufpa.br/quimicanalitica/padronizatioossulfato.htm>. Acessa em 15 de julho de 2014.
148. Teste de Cochran. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/content/161-teste-de-igualdade-das-vari%C3%A2ncias>. Acessado em 10 de janeiro de 2013.
149. MERMET, J.; POSSEU, E. ICP emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit. *Appl. Spectrosc.*, **49**, 12-15, 1995.
150. Membranas da Mn. Disponível em: <http://www.carvalhaes.net/trunfo/site/resources/upload/catalogos/anexo1303851338.pdf>. Acessado em 10 de fevereiro de 2013.
151. KOTZ, J. C.; TREICHEL, P. M. Química geral 2 e reações químicas. 5ª Ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005. 404 p.
152. FORD, C.; JOHNSON, L. A. Ascorbic Acid Interferes with an automated urinary iodide determination based on the Cerlo-arsenlous acid reaction. *Clin. Chem.*, **37**, 759, 1991.
153. NAKAIE, C. M.; CARDIERI, J. M. A.; ROZOV, T. Drogas mucolíticas e expectorantes. *Pediat.*, **5**, 339-346, 1983.
154. Evolução farmacológica dos mucolíticos. Disponível em: http://www.internationalarchivesent.org/conteudo/acervo_port.asp?id=86. Acessado em 05 de Março de 2014.

152. Antibióticos nas infecções das vias aéreas. Disponível em: <http://www.Alergo pneumoped.com.br/aulas/IVAS-congresso%20mineiro%20de%20pediatria1.pdf>. Acessado em 05 de Março de 2014.

153. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia brasileira. 5ª Ed. Brasília: ANVISA, 2010. 53, 54 p.

154. Farmacologia do aparelho respiratório. Disponível em: http://www.proac.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/9_APARELHO_RESPIRATORIO_Tosse_e_antigripais.pdf. Acessado em 05 de Março de 2014.

155. MUÑOZ, F. J.; BELLIDO, J.; MOYANO, J. C.; ALVAREZ, M. J.; JUAN, J. L. Adverse reaction to potassium iodide from a cough syrup. *Allergy Net*, **52**, 111, 112, 1997.

156. BRASIL. Resolução nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 de abril 1999. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/nvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

157. BRASIL. Lei nº 9787, 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 fev 1999. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l787www.htm. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

158. BRASIL. Resolução nº 35, de 15 de junho de 2012. Dispõe sobre os critérios de indicação, inclusão e exclusão de medicamentos na Lista de Medicamentos de Referência. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 jun. 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/nvisa/2010/res0017_16_04_2010.html. Acessado em 25 de fevereiro de 2014.

159. GUTIERREZ, M. C.; GOMEZ-HENS, A.; PEREZ-BENDITO, D. Stopped-flow Determination of iodide in pharmaceutical and food samples. *Analyst*, **114**, 89, 1989.
160. AGUIAR, M. A. S.; BERBIGÃO, P. N.; MORI, V. Determinação amperométrica de iodeto em soluções expectorantes orais com análise por injeção em fluxo usando a reação iodeto/nitrito. *Eclética*, **31**, 64, 2006.